



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

**El efecto de la rehidratación y tratamientos térmicos
en la estructura de proteínas en películas generadas
por evaporación de gotas.**

Tesis que presenta

Yojana Jautzi Pupuri Carreón Herrera

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en
Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Apodaca, Nuevo León

Marzo, 2019

Agradecimientos

Agradezco:

A mi asesora, Dra. Hilda Mercado, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su apoyo y amistad.

A los sinodales, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo.

Al Dr. Carlos Ruíz por proporcionarnos algunos reactivos y accesorios, así como por las puntuales observaciones a este proyecto.

Al CONACyT por su apoyo financiero durante el doctorado.

Al proyecto CONACyT 236505.

Al CINVESTAV-Monterrey, Apodaca, Nuevo León.

Jautzi

Marzo 2019, Monterrey-México.

Índice general

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1. Proteínas: propiedades y antecedentes	9
1.1. Proteínas	9
1.2. Hidratación en proteínas	12
1.3. Estudio de proteínas a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	14
1.4. Formación de películas de proteínas	17
2. Patrones producidos por gotas secas de mezclas binarias de proteínas suspendidas en agua	19
2.1. Materiales y métodos	21
2.1.1. Preparación de proteínas	21
2.1.2. Evaporación de la gota	21
2.1.3. Análisis de imágenes	21
2.2. Resultados y discusión	22
2.2.1. Efecto de la concentración de proteína en la formación del patrón . .	24
2.2.2. Formación de patrones de soluciones de mezclas de proteínas	28
2.3. Conclusiones	32

3. Efecto de la re-hidratación de películas de proteínas	33
3.1. Materiales y métodos	35
3.1.1. Preparación de proteínas	35
3.1.2. Fabricación de películas de proteínas	35
3.1.3. Proceso de re-hidratación en películas de proteínas	36
3.1.4. Mediciones por FTIR	36
3.1.5. Análisis de espectros	36
3.1.6. Diferencia máxima relativa de absorbancia	37
3.2. Resultados y discusión	37
3.3. Conclusiones	43
4. Efecto de tratamientos térmicos sobre la estructura de la BSA	45
4.1. Materiales y métodos	48
4.1.1. Preparación de proteínas	48
4.1.2. Tratamiento térmico en soluciones de proteínas	48
4.1.3. Fabricación de películas de proteínas	48
4.1.4. Mediciones por FTIR	48
4.1.5. Análisis de espectros	49
4.1.6. Diferencia máxima relativa de absorbancia	50
4.2. Resultados y discusión	50
4.3. Conclusiones	53
5. Conclusiones	55

Resumen

En este proyecto se investigó la formación de patrones de gotas de soluciones de proteínas a partir de su evaporación, así como el efecto de la rehidratación y de tratamientos térmicos sobre la estructura de las proteínas en tales agregados. Estos fenómenos son caracterizados mediante el cálculo de medidas de complejidad y el análisis de los correspondientes espectros de infrarrojo. El análisis estructural muestra que las mezclas de proteínas libres de sal contienen patrones complejos. Esto ocurre porque las interacciones entre proteínas con diferente estructura generan la formación de pequeños agregados y cúmulos de cristales. Además, observamos que mientras el grosor del anillo de café aumenta con la concentración de proteína, el anillo más estrecho aparece a una concentración de proteína relativa de 1:1. Por otra parte, encontramos que mientras la morfología de las películas de proteínas sin sales no cambia con la rehidratación, las películas de proteínas con sal se modifican. El análisis con espectroscopía de infrarrojo muestra que la hidratación de los depósitos de proteínas sin sales incrementa con los ciclos de hidratación, pero en los depósitos con sales esto no ocurre. Nuestros resultados revelan que los diferentes tratamientos térmicos por debajo de 50°C no afectan la estructura de la proteína; sin embargo, por arriba de 90°C el cambio estructural en las proteínas incrementa con el número de recocidos. Por lo tanto, para una mejor comprensión de la formación de depósitos de biofluidos complejos y el estado estructural de sus componentes, es necesario entender la interacción entre multicomponentes, así como el efecto de la rehidratación y de tratamientos térmicos en tales depósitos.

Abstract

In this project the formation of droplet patterns of protein solutions after their evaporation was investigated, as well as the effect of rehydration and thermal treatments on the structure of the proteins in such aggregates. These phenomena are characterized by the calculation of measures of complexity and analysis of the corresponding infrared spectra. The structural analysis shows that salt-free protein mixtures contain complex patterns. This occurs because interactions between proteins with different structures generate the formation of small aggregates and clusters of crystals. In addition, we observed that the thickness of the coffee ring increases with the concentration of protein, the narrowest ring appears at a relative protein concentration of 1: 1. On the other hand, we find that while the morphology of protein films without salts does not change with rehydration, protein films with salt are modified. Infrared spectroscopy analysis shows that hydration of protein deposits without salts increases with hydration cycles, but in salt deposits this does not occur. Our results reveal that different thermal treatments below 50°C do not affect protein structure; however, above 90°C the structural change in proteins increases with the number of annealings. Therefore, for a better understanding of the formation of complex biofluid deposits and the structural state of their components, it is necessary to understand the interaction between multicomponents, as well as the effect of rehydration and thermal treatments on such products deposits.

Introducción

Las películas producidas por la evaporación de micro-gotas son fenómenos ubicuos en la tecnología y procesos médicos, se observan por ejemplo, en la deposición de materiales, en la impresión de inyección de tinta, en bioensayos, en la selección de medicamentos, en el reconocimiento de ADN/ARN y de bebidas consumibles [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. En el contexto de pruebas para el diagnóstico de enfermedades, los patrones dan información sobre el estado de salud de un individuo. Uno de los sistemas más prometedores fue descrito por T.A. Yakhno et al. [10], donde demuestran que utilizando el reconocimiento de patrones, es posible detectar mujeres que tuvieron partos prematuros de 34 semanas. También, los patrones muestran diferencias en el suero sanguíneo de pacientes con hepatitis [11], leucemia, tuberculosis y cáncer [12, 13].

La formación de patrones depende de los mecanismos de transporte en el interior de la gota y los fenómenos de agregación. El transporte de masa resulta de la competencia entre los flujos capilares y los flujos de Marangoni. Los flujos capilares se mueven radialmente hacia afuera (del interior al exterior de la gota) para compensar la pérdida de masa debido a la evaporación de las moléculas de agua que se produce principalmente en el borde de la gota. Bajo este proceso, la deposición de partículas ocurre en la línea de contacto, formando el comúnmente llamado efecto del “anillo de café”. Los flujos de Marangoni son generados por surfactantes y gradientes de temperatura que fuerzan al fluido a circular hacia el interior de la gota. De hecho, este mecanismo de transporte puede erradicar la formación del anillo de café. Debemos remarcar que ambos flujos dependen estrechamente de la temperatura de la superficie y de la humedad, debido a que la primera cambia los gradientes de tensión

superficial (responsables de los flujos de Marangoni) y la segunda variable determina la tasa de evaporación de moléculas de agua (responsable de los flujos capilares). Por otro lado, el fenómeno de agregación está mediado por fuerzas anisotrópicas (fricción, electroestáticas y adherencia, entre las macromoléculas y el sustrato de vidrio) que surgen durante el proceso de evaporación.

Se ha mostrado que un buen punto de partida para comprender los mecanismos de transporte y los procesos de agregación dentro de una gota de un biofluido de relevancia, es el estudio de soluciones simples con biomoléculas. La interacción proteína-sal permite la formación de una gran variedad de agregados complejos [14, 15, 16, 17, 18]. Los depósitos compuestos por lisozima y NaCl muestran un anillo periférico amorfo y formas dendríticas [19, 20], mientras que los depósitos de proteínas de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) y NaCl muestran estructuras como rosetas, escalpelos, vieiras, flechas chinas y patrones de zigzag [16]. De hecho, las diferentes sales que interactúan con la misma proteína generan diferentes agregados [21]. Estas estructuras surgen de mecanismos complejos de agregación de iones en una película de proteína [17]. Además, se ha encontrado que la espectroscopía de infrarrojo es una útil herramienta para escudriñar la estructura de las proteínas en películas y también como técnica en el diagnóstico de enfermedades [9]. Pequeñas variaciones en la concentración de proteínas, observadas en espectros IR, pueden indicar diferentes enfermedades [22].

A pesar del conocimiento acumulado sobre estudios de gotas, se sabe muy poco acerca de cómo la interacción entre proteínas con diferentes estructuras afecta el proceso de secado. De hecho, las proteínas pueden exhibir una amplia gama de interacciones en diferentes niveles asociadas con su estructura [14, 15]. Un pequeño cambio en ellas (como los producidos por el calentamiento) puede promover diferentes interacciones que conducen a un cambio significativo en un sistema biológico [16]. Además, no se conoce cómo la rehidratación de películas, los tratamientos térmicos en depósitos, o incluso el pH en las soluciones; podría modificar la morfología de los depósitos y la estructura molecular de sus componentes.

En este trabajo se investiga la formación de patrones a partir de la evaporación de gotas conteniendo proteínas, así como el efecto de la rehidratación y de tratamientos térmicos

sobre la estructura de las proteínas en tales agregados. El material de este documento está organizado de la siguiente manera: En el capítulo 1 se describen los elementos básicos que describen las proteínas y aspectos relevantes de su estudio a través de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. Además, se incluyen los mecanismos involucrados en la formación de películas de proteínas.

En el capítulo 2 se presenta el estudio experimental sobre la formación de patrones producidos por la evaporación de suspensiones de gotas conteniendo mezclas binarias de proteínas. Además, exploramos las características estructurales de dichos depósitos estimando medidas de la complejidad, como lo son la dimensión fractal y la función radial de distribución de masa.

En el capítulo 3 se presenta el estudio experimental del efecto de la rehidratación de depósitos de proteínas. Estos fenómenos son caracterizados mediante el cálculo de medidas de complejidad y el análisis de los correspondientes espectros de infrarrojo.

En el capítulo 4 se presenta el estudio experimental del efecto de tratamientos térmicos sobre la estructura de las proteínas globulares en películas.

1

Proteínas: propiedades y antecedentes

1.1. Proteínas

Las proteínas forman estructuras tridimensionales tan compactas, que su densidad es cercana a la densidad de un cristal hecho de aminoácidos [23]. Su organización estructural se divide en cuatro niveles. Una combinación lineal de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos conforma la estructura primaria (cadena principal). La estructura secundaria la conforman hélices α y hojas β que emergen de la interacción entre aminoácidos de la cadena principal. En un medio acuoso los aminoácidos polares se posicionan en el exterior de la estructura mientras que los apolares se internalizan, formando interacciones hidrófobas y puentes de disulfuro. Este plegamiento específico de la cadena polipeptídica forma la estructura terciaria. Por último, la estructura cuaternaria involucra la unión de más de una cadena de aminoácidos con estructura terciaria para formar complejos proteicos. Ver Fig. 1.1.

Los enlaces peptídicos a lo largo de la cadena principal son “fuertes” (enlaces covalentes), pero las conexiones subyacentes son “débiles” (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals) (Ver tabla 1.1). Éstos últimos, pueden romperse debido a fluctuaciones térmicas y generar una gran cantidad de movimientos [23]. Éste proceso, llamado desnaturalización, afecta los diferentes niveles estructurales de las proteínas. En la estructura cuaternaria las subunidades de proteínas se separan mientras que, en la

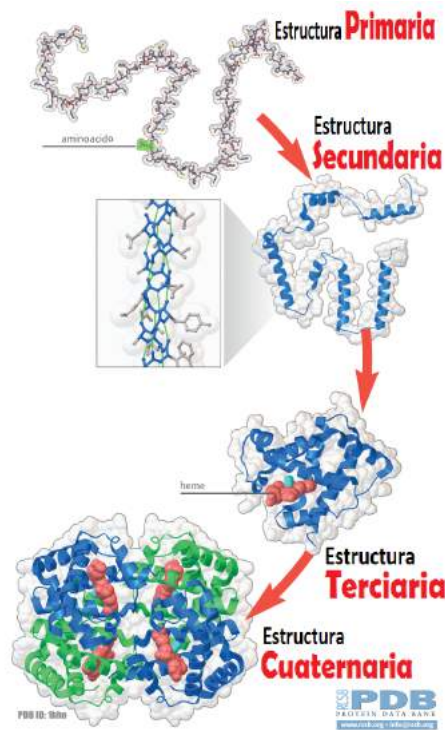
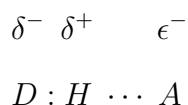


Figura 1.1: La secuencia de aminoácidos en la estructura primaria definirá el plegamiento y función de la proteína. Los enlaces de hidrógeno (ver líneas verdes del inset), entre aminoácidos forman las hélices α (azul) y las hojas β , elementos particulares de la estructura secundaria. Las dos posibles estructuras terciarias son la globular y la fibrilar. La unión de dos (o más) cadenas polipeptídicas forman una molécula (estructura cuaternaria) funcional con varias subunidades. Imagen adaptada de www.rcsb.org/pdb-101.

estructura terciaria se interrumpen distintos enlaces como: enlaces entre las cadenas laterales de los aminoácidos (puentes de disulfuro entre cisteínas), enlaces dipolo-dipolo entre cadenas laterales polares de aminoácidos y enlaces inducidos por fuerzas de Van Der Waals entre cadenas laterales no polares. En la estructura secundaria las proteínas pierden todos los patrones de repetición regulares como las hélices α y adoptan formas aleatorias.

La mayoría de las interacciones que sustentan el plegamiento de las proteínas provienen de los enlaces de hidrógeno [24, 25, 26, 27, 28]. De hecho, la conformación y estabilidad de estructuras secundarias (hélices α y hojas β) y la selectividad en interacciones proteína-ligando son reguladas por este tipo de enlace [24]. Un tipo específico de enlace de hidrógeno entre dos átomos es el enlace por puente de hidrógeno [23, 29]. En él, un átomo donador (D)

y un átomo aceptor (A) simplemente son unidos al hidrógeno, por lo que se puede considerar que esta interacción es parcialmente covalente y parcialmente electrostática [24, 30, 31]. El enlace por puente de hidrógeno se muestra de la siguiente forma:



Donde, el ion positivo (H) está localizado entre dos cargas negativas. La interacción óptima se produce si las cargas son colineales mientras que, los enlaces no lineales son más débiles. Sólo los átomos más electronegativos (F, O, N) forman enlaces de hidrógeno.

Los enlaces más fuertes que contribuyen a la estructura de las proteínas son los covalentes, que se forman cuando dos átomos comparten electrones. Por ejemplo, los enlaces peptídicos (-CO-NH-), que son un tipo específico de enlaces covalentes, conforman la cadena principal de las proteínas y se presentan entre el grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido y el grupo amino (-NH₂) de otro aminoácido. El enlace de disulfuro (-S-S-), formado entre los grupos tiol de los aminoácidos cisteínas, es otro tipo de enlace covalente en proteínas. Los puentes de -S-S- forman enlaces entrecruzados que conectan cadenas polipeptídicas, responsables de estabilizar la conformación estructural en proteínas.

Debemos remarcar que las proteínas pueden asumir un gran número de diferentes conformaciones o subestados conformacionales que pueden tener las mismas o diferentes

Interacción	$kJmol^{-1}$	Observaciones
Covalente	200-1000	“fuerte”
Electrostática	10-30	
Enlace de Hidrógeno	5-20	
Van der Waals	1-10	Fuerza de dispersión
Hidrofóbica	0-20	No es una verdadera fuerza

Cuadro 1.1: En la tabla se muestran algunas características de diversos tipos de interacciones en las proteínas [23].

funciones biológicas. Estas van desde formar un sistema rígido que mantiene la estructura celular o realizar un trabajo específico, como almacenar energía o materia (oxígeno) o catalizar una reacción. Las proteínas globulares son uno de los tipos más comunes y estables. Gran parte de su estructura está constituida a partir de fragmentos de hélices α y hojas β . La participación de enlaces de hidrógeno en cada enlace peptídico que conforma a las hélices α concede una gran estabilidad a esta estructura. Además, estos enlaces también dominan la interacción de segmentos estirados de la cadena principal que conforman las láminas β .

La función biológica de una proteína depende de su correcto plegamiento y estabilidad estructural por lo tanto, su desnaturalización afecta profundamente sus propiedades funcionales [32, 33, 34]. La desnaturalización es el proceso en el cual las proteínas pierden su estabilidad y su estructura nativa mediante la aplicación de un compuesto o estrés externo, tales como solventes orgánicos e inorgánicos, cambios en pH, temperatura, entre otros. La desnaturalización por calor, en proteínas, es asociada al rompimiento de enlaces de fuerzas estabilizadoras como las interacciones hidrófobas y los puentes de hidrógeno [33]. Se ha mostrado que la temperatura y el contenido del agua de proteínas desnaturalizadas que se hidratan, condicionan el estado de las mismas, pudiendo ser altamente elástico o vítreo [35]. La transición vítrea puede reflejar la dependencia intrínseca a la temperatura de los movimientos de los átomos en la propia proteína, en el disolvente unido a la superficie de la proteína, o puede reflejar las contribuciones de ambos [36]. Por lo tanto, entender la dinámica del rompimiento de puentes de hidrógeno durante el calentamiento de proteínas, puede dar una mejor comprensión sobre la flexibilidad de las proteínas en diferentes estados de hidratación.

1.2. Hidratación en proteínas

La hidratación en proteínas determina en gran medida su estructura tridimensional, su dinámica conformacional [37, 38] y actividad [39, 40, 41]. El proceso de hidratación se puede considerar como un proceso de adición de moléculas de agua a una proteína seca, hasta que alcanza un nivel de hidratación más allá del cual la adición de moléculas de agua no produce cambios y solo diluye la proteína [42]. Se pueden identificar dos tipos de moléculas de agua

de hidratación [43]. El primero, llena los vacíos entre las cadenas de la proteína; por ejemplo, las moléculas de agua que penetran en la albúmina sérica cuando se hincha al cambiar su pH por debajo de 4. El segundo tipo, son moléculas de agua relativamente ligadas; por ejemplo, moléculas de agua ligadas a los grupos polares en la superficie de la proteína.

El agua asociada a una proteína en el punto final de hidratación se le conoce como capa de hidratación. Esta cubierta representa la cobertura conformada por una sola capa de moléculas de agua en la superficie de la proteína. El agua fuera esta capa se perturba en un grado menor y por lo general no se detecta mediante mediciones de propiedades como la capacidad térmica, el volumen o el contenido de calor. Por lo tanto, en una solución concentrada de proteína o en un polvo de proteína húmeda, a niveles de hidratación superiores al punto final de hidratación, la perturbación de la multicapa del disolvente es pequeña en comparación con la perturbación dentro de la monocapa, y la primera puede verse como un efecto de segundo orden [42].

Si una proteína se disuelve en agua y posteriormente se elimina el agua gradualmente, queda una cantidad residual de agua unida a la proteína [25]. La hidratación de una proteína se puede describir en varios pasos [25, 42, 44, 45, 46, 47] según lo establecido por una variedad de métodos: a) El primer evento importante es la ionización de grupos cargados o altamente hidrófilos que se unen al agua en la secuencia $COO^- > NH_3^+ > NH_2 > COOH$. En el caso de la lisozima, los protones y las moléculas de agua se redistribuyen hasta que este proceso se completa con aproximadamente 0,1 g de agua por g^{-1} de lisozima. b) Cambios en el espectro infrarrojo (IR) de las bandas amida I y II indican que la hidratación de los grupos $C = O$ y NH ocurre simultáneamente, pero la hidratación del NH se completa primero. Esto es debido a que el grupo NH dona un enlace de hidrógeno y se une solo a una molécula de agua, mientras que el grupo $C = O$ se puede unir a dos moléculas de agua. Debido a que las moléculas de agua se encuentran predominantemente en la periferia de las proteínas con algunas encerradas en el interior, los enlaces de hidrógeno establecidos entre cadenas principales (o estructura secundaria) predominan en el núcleo de las proteínas. La estructura secundaria está menos definida en la periferia donde los grupos peptídicos $C = O$ y $N-H$ tienen más libertad para interactuar con las moléculas de agua [25]. c) Para la lisozima, el

inicio de su actividad catalítica casi coincide con la cobertura total de los sitios polares con agua. Esto podría dar a la enzima la flexibilidad que necesita para una actividad completa.

d) A mayor hidratación, se produce una condensación del agua para completar el proceso de hidratación.

1.3. Estudio de proteínas a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en biofluidos ha surgido como una poderosa herramienta para escudriñar la estructura de macromoléculas [48, 49, 50]. El análisis de sus espectros puede indicar qué moléculas están presentes en una muestra y en qué concentraciones. Los patrones complejos que se forman tras la evaporación de gotas de biofluidos han sido estudiados durante los últimos años [51] y su estudio con espectroscopía ha mostrado ser un prometedor método para el diagnóstico de enfermedades [52, 53].

La varianza bioquímica a través de una gota seca puede detectarse utilizando técnicas espectroscópicas, como la transmisión o la reflectancia total atenuada (ATR). En el muestreo de transmisión, un haz infrarrojo pasa a través de una fina película de muestra y luego choca contra el detector. Durante la interacción de luz-materia, el haz infrarrojo induce a una molécula a entrar en un modo vibratorio superior debido a la transferencia de “paquetes de energía” a ciertas longitudes de onda, que dependerán de la composición de la muestra bajo análisis [53]. Estos intercambios dan como resultado un espectro, que se representa mediante una gráfica de la intensidad de luz (transmitancia o absorbancia) en función de alguna propiedad de la luz como la longitud de onda (λ) o el número de onda (cm^{-1}). El espectro está constituido por bandas (picos), que pueden interpretarse cualitativamente (posición del pico) y cuantitativamente (intensidad del pico/área, intensidad relativa).

En el análisis de transmisión, generalmente la muestra se coloca en una celda transparente al infrarrojo. En la tabla 1.2, se muestra una lista de los materiales transparentes al infrarrojo más comunes. Entre ellos, los cristales de ZnSe son los más populares debido a

su rango espectral relativamente amplio y su relativa libertad respecto de absorbanza de IR en la región 4000-400 cm^{-1} . Además, su transparencia visible proporciona la garantía del posicionamiento de la muestra dentro de una celda.

Material	cm^{-1} límite inferior	Solubilidad en agua	Costo
KBr	400	Sí	
CsI	200	Sí	
AgCl	400	No	
AgBr	300	No	
ZnSe	700	No	
Ge	600	No	

Cuadro 1.2: Materiales transparentes al infrarrojo comúnmente usados en el análisis de transmisión [54].

En el caso específico del estudio de proteínas con espectroscopía infrarroja, se han detectado 9 bandas de relevancia nombradas Amida A, B y I-VII [55, 56, 57]. Las bandas de IR características de las proteínas y péptidos se enumeran en la Tabla 1.3. Las bandas amidas surgen de las vibraciones de grupos peptídicos que proporcionan información acerca de la estructura secundaria de las proteínas. Las bandas Amida I y II son las más prominentes del esqueleto proteico [55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62].

La banda Amida A ($\sim 3310-3270\text{ cm}^{-1}$) surge de la vibración de estiramiento NH, y su frecuencia depende de la fuerza del enlace de hidrógeno. Esta banda suele ser parte de un doblete de resonancia de Fermi cuyo segundo componente (Amida B) absorbe débilmente entre $\sim 3100-3030\text{ cm}^{-1}$. Las respuesta de estas bandas no necesariamente son directamente sensibles a la conformación de la cadena proteica. Su frecuencia depende de la fuerza del enlace de hidrógeno $N-H \cdots O=C$. Por lo tanto, estos modos de vibración nos proporcionan información sobre las variaciones estructurales. El ancho de banda denota la estabilidad de la estructura. Una mayor distribución de los enlaces peptídicos de hidrógeno refleja una banda más ancha; esto sugiere una disminución en la estabilidad de la estructura [64].

Denominación	Frecuencia aproximada cm^{-1}	Descripción
Amida A	3300	estiramiento NH
Amida B	3100	estiramiento NH
Amida I	1690-1600	estiramiento C=O
Amida II	1575-1480	estiramiento CN, flexión NH
Amida III	1301-1299	estiramiento CN, flexión NH
Amida IV	767-625	flexión OCN
Amida V	800-640	flexión fuera del plano NH
Amida VI	606-537	flexión fuera del plano C=O
Amida VII	200	torsión esquelética

Cuadro 1.3: Bandas infrarrojas características del enlace peptídico [53, 55, 63].

La banda Amida I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) se origina a partir de la vibración de estiramiento $C = O$ del grupo amida, una contribución menor surge del estiramiento del enlace $C - N$ y la flexión del enlace $N - H$. La mayoría de las proteínas contienen varios tipos de estructuras secundarias (hélices α , hebras β , giros β y giros π) de las cuales un tipo puede predominar. Por lo tanto, esta banda es un compuesto de absorbancias que surgen de los diversos tipos estructurales, que resulta en una banda amplia y "distorsionada". Las frecuencias de los componentes son determinadas mediante el acoplamiento del momento de transición de los osciladores $C = O$ y el enlace de hidrógeno del grupo $C = O$ a los donantes de protones (principalmente el grupo NH) [60, 65].

La banda Amida II ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$) se deriva principalmente de la flexión de NH y las vibraciones de estiramiento C-N. Esta banda muestra una menor sensibilidad conformacional de la proteína que su contraparte amida I [55].

En estas descripciones, se observaría que las frecuencias de absorciones de las bandas amida I y II se ven influenciadas por la fuerza de cualquier enlace de hidrógeno que involucre a los grupos amida $C = O$ y $N - H$ [57]. En las proteínas, cada uno de los grupos amida está involucrado en una estructura secundaria de algún tipo (una hélice, una hoja extendida,

etc.) que a su vez están asociados con un patrón de enlaces de hidrógeno característico.

1.4. Formación de películas de proteínas

La formación de películas de proteínas a partir de la evaporación de gotas depende en gran medida de la concentración, la humedad relativa, el tamaño de la gota y el ángulo de contacto [19, 66, 67, 68, 69]. Su formación inicia al depositar una gota de solución de proteínas sobre una superficie. Durante la evaporación de la gota, surge una competencia compleja entre flujos capilares (impulsados por la continuidad) y flujos de Marangoni (impulsados por los gradientes de tensión superficial) [70]. Los flujos capilares emergen cuando inicia la evaporación en el borde de la base de la gota. El fluido se desplaza radialmente hacia afuera para compensar la masa evaporada. Además, la gota permanece con un diámetro constante y el ángulo de contacto disminuye debido a la deposición de partículas en la línea de contacto. Esto genera el “anillo de café”; un patrón de anillo formado en los bordes de la gota [71, 72, 73]. Los flujos de Marangoni, por otra parte, son producidos por los surfactantes y los gradientes de temperatura y pueden considerarse opuestos a los flujos capilares. Éstos hacen que el líquido circule hacia adentro, deteniendo el efecto del anillo de café. De hecho, cuando los surfactantes están presentes, los gradientes de tensión superficial promueven la deposición uniforme debido a la formación de remolinos, vórtices, flujos de recirculación y flujos de entrada radial [73, 74, 75, 76]. En general, la tensión superficial disminuye con la concentración de surfactante.

Los flujos de Marangoni también pueden modificarse por la distribución de la temperatura de la superficie en las gotas, pero hay dos puntos de vista diferentes sobre cómo puede ocurrir esto. El primero sugiere que el borde de la gota es más frío que su ápice debido a una mayor evaporación en esta región [77]. El segundo propone que la parte superior de la gota está a una temperatura más baja debido a la distancia del sustrato, lo que implica una mayor conducción [70, 78].

Al depositar una gota sobre una superficie, esta puede incrementar su diámetro en los primeros instantes de evaporación. La extensión de la línea de contacto obedece a un balance

de fuerza dado por la ecuación de Young: $\delta_{sv} = \delta_{sl} + \delta_{lv} \cos(\theta)$, donde δ_{sl} , δ_{lv} y δ_{sv} son las tensiones de superficie sólido-líquido, líquido-vapor y sólido-vapor, y θ el ángulo de contacto. Esta ecuación da el equilibrio mecánico de la línea de contacto.

2

Patrones producidos por gotas secas de mezclas binarias de proteínas suspendidas en agua

En este capítulo presentamos un estudio experimental sobre la formación de patrones producidos por la evaporación de suspensiones de gotas que contienen una mezcla binaria de proteínas. Exploramos el aspecto estructural de tales películas utilizando microscopía óptica. A diferencia de lo que se ha reportado en la literatura, encontramos que la sal es innecesaria para la formación de estructuras complejas, tales como agregados de cristales, ramas dendríticas y onduladas, y cadenas entrelazadas. Estas características estructurales nos permiten diferenciar entre mezclas binarias de proteínas. Finalmente, discutimos el uso potencial de este hallazgo para revelar la presencia de suspensiones proteicas, el estado plegado y desplegado de una proteína, así como sus cambios estructurales.

Los patrones formados por la evaporación de una gota que contiene moléculas biológicas han proporcionado información significativa sobre ciertas patologías. En este contexto, varios trabajos proponen el estudio de soluciones proteicas como modelo para entender la formación de películas de fluidos biológicos.

La formación de patrones producidos por la evaporación de gotas que contienen biofluidos

es un tema de gran relevancia debido a su potencial uso para el diagnóstico de patologías. Por ejemplo, las gotas de suero de sangre de pacientes con leucemia, anemia, hepatitis viral tipo B, tuberculosis y cáncer de mama producen patrones complejos y bien diferenciados [10, 12, 79]. Un buen enfoque para la formación de tales depósitos ha sido el estudio de biomoléculas [13, 80, 81, 82]. En particular, se han utilizado soluciones proteicas como modelos biológicos simples [19, 66, 67].

La formación de patrones en películas de proteínas comienza con la deposición de partículas coloidales en la periferia formando el llamado “anillo de café”. Las películas formadas se ven afectadas por interacciones proteína-proteína y proteína-sustrato las cuales promueven la agregación de proteínas en el sustrato [67, 71, 78, 83, 84, 85, 86, 87].

La sal promueve la deshidratación de las proteínas haciendo más fuertes las interacciones intermoleculares entre ellas. Esto produce agregados complejos en el interior de las películas, como cristales, rosetas, festones y formas dendríticas, que están rodeados por un anillo de grietas en la orilla de la película [14, 15, 16, 17, 18].

A pesar de los numerosos estudios sobre gotas, se sabe muy poco sobre cómo la interacción entre proteínas con diferentes estructuras afecta el proceso de secado. Las proteínas pueden presentar una amplia gama de interacciones a diferentes niveles asociados a su estructura [88, 89]. De hecho, un pequeño cambio en ellos (como los producidos por el calentamiento de las proteínas) puede promover diferentes interacciones que conllevan a un cambio significativo en un sistema biológico [90]. Las interacciones proteína-proteína (PPIs) se refieren generalmente a un contacto físico con el acoplamiento molecular entre dos o más moléculas de proteínas, que se producen en una célula o en un organismo vivo como resultado de eventos bioquímicos [91, 92, 93]. Las asociaciones entre subunidades de proteínas están dominadas por las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y los efectos hidrofóbicos [94, 95, 96].

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Preparación de proteínas

Se utilizaron lisozima (Sigma-Aldrich, L6876) y albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, A2153) de alta pureza para preparar soluciones stock. Estas se disolvieron en agua desionizada (Mili-Q, R=18.2 MΩcm) a una concentración de 2.00 *wt* % a 25°C. Las soluciones stock se diluyeron de acuerdo con las concentraciones deseadas. Las mezclas de soluciones binarias de proteínas se prepararon combinando las soluciones que contenían un sólo tipo de proteína. Una muestra de las soluciones se desnaturalizaron térmicamente a 90°C durante 100 min. Nos referiremos a estas soluciones como: BSA* y Lisozima*. Las soluciones se almacenaron a 2°C y antes de su deposición se termalizaron a temperatura ambiente.

2.1.2. Evaporación de la gota

Las gotas de las soluciones se colocaron en un portaobjetos de vidrio limpio utilizando una micropipeta; en el portaobjeto se colocaron 10 gotas con un volumen de 2 μL. Las gotas se evaporaron bajo condiciones ambientales controladas: $T = 37^{\circ}C$ a humedad relativa del 30 %. El proceso de evaporación fue grabado a 30 fps con una cámara digital (Nikon Digital, SLR Camera D3200). Después de 30 min se observaron los depósitos en condiciones ambientales utilizando un microscopio (Velab, VE-M4, 4× y 10×).

2.1.3. Análisis de imágenes

Utilizamos el perfil de densidad radial $I(r)$ para realizar el análisis estructural de los patrones. Esta cantidad describe un perfil de intensidades producidas por círculos concéntricos en función de la distancia radial [82]. Para los objetos 2D, esta cantidad es dada por la siguiente expresión:

$$I(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} i(r, \theta) d\theta, \quad (2.1)$$

donde $i(r, \theta)$ es la intensidad de luz local contenida en un círculo de radio r . Cada valor de $I(r)$ representa la suma de las intensidades de los píxeles alrededor de un círculo con radio r .

Para cuantificar la complejidad de las pequeñas estructuras circulares dentro de las películas de proteínas, medimos la dimensión fractal de la masa d usando la ecuación $m = r^d$, donde d es el exponente de la ley de potencia y m es la masa media en una caja de lado r . Aquí, el número de píxeles encerrados dentro del área de una imagen está correlacionado con la masa de un objeto en una región delimitada. El análisis de los agregados se realiza utilizando las fotografías correspondientes en escala binaria. El número de píxeles en un elemento de área corresponde a la masa contenida en el mismo elemento, que se estima en 580 cuadrados concéntricos igualmente separados. Este procedimiento se repite en diferentes lugares de la estructura. Finalmente, se calcula el promedio del número de píxeles de cada caja. La pendiente del $\log(m)$ en función del $\log(r)$ es la dimensión fractal de la masa correspondiente d . Esta cantidad es una herramienta útil para caracterizar una amplia diversidad de estructuras [97, 98, 99, 100].

2.2. Resultados y discusión

Morfologías del patrón de proteínas

La Fig. 2.1 muestra las películas correspondientes a las proteínas (BSA, BSA*, lisozima y lisozima*), y los depósitos de mezclas de proteínas BSA-lisozima, BSA-lisozima*, BSA*-lisozima y BSA*-lisozima* a una concentración relativa de 50:50 (v/v). Utilizamos el perfil de densidad radial para caracterizar la morfología de estas películas, ver Fig. 2.1b y c. En general, no hay diferencias significativas entre las películas formadas por soluciones que contienen un sólo tipo de proteína. Sin embargo, cuando las proteínas se mezclan, aparecen características más complejas. La Fig. 2.1b muestra que todos los depósitos formados por una sola proteína tienen una deposición uniforme que se correlaciona con la región plana en el perfil de intensidad radial $I(r)$. Los pequeños picos de $I(r)$ están asociados con la formación de

grietas, y el pico mayor en el borde de $I(r)$ es producido por el anillo de café. Sin embargo, los depósitos cambian cuando las dos proteínas se mezclan. La diferencia estructural más notoria aparece en el interior de las películas. Mientras que las mezclas de BSA-lisozima muestran la formación de una pequeña estructura circular (denotado en el cuadro amarillo de la Fig. 2.1a), las mezclas de BSA-lisozima* muestran una pequeña cavidad (cuadro púrpura de la Fig. 2.1a), ver las pequeñas curvas convexas de la $I(r)$ de la Fig. 2.1c. Por otro lado, las mezclas que contienen BSA* muestran una gran región con rugosidad en el interior de la película. Esta característica estructural se muestra por una señal ruidosa (picos pequeños) en la $I(r)$.

Los fenómenos de nucleación y agregación son responsables de la morfología final de un agregado. La teoría clásica de estos procesos [101, 102, 97], se ha extendido con éxito para describir el fenómeno de cristalización molecular [103], en soluciones [104], proteínas [105], sistemas coloidales [106] y medios granulares. Sin embargo, a pesar de varios intentos para desarrollar la termodinámica fuera del equilibrio [107] y la mecánica estadística [108] de pequeños agregados, todavía no se ha establecido una teoría completa. Esto debido a la naturaleza intrínseca de los procesos fuera del equilibrio que esta involucrada en la nucleación y agregación, y además, al régimen de alta disipación en el que ocurren estos procesos. Por lo tanto, desde un punto de vista teórico aun no es posible predecir la morfología final de una estructura, y aún persiste un punto interesante: ¿Qué tipo de estructuras tienen mayor probabilidad de formarse? Afortunadamente, esto puede responderse experimentalmente asociando la frecuencia de aparición de una estructura con una probabilidad estadística. Nosotros encontramos que las mezclas binarias de BSA-lisozima* siempre forman cavidades mientras que las mezclas BSA-lisozima siempre forman estructuras circulares diferentes. Esto significa que la probabilidad de aparición de cavidades es 1. Además, podemos deducir que no hay una estructura energéticamente más favorable que domine sobre las otras debido a que las pequeñas estructuras circulares siempre son diferentes.

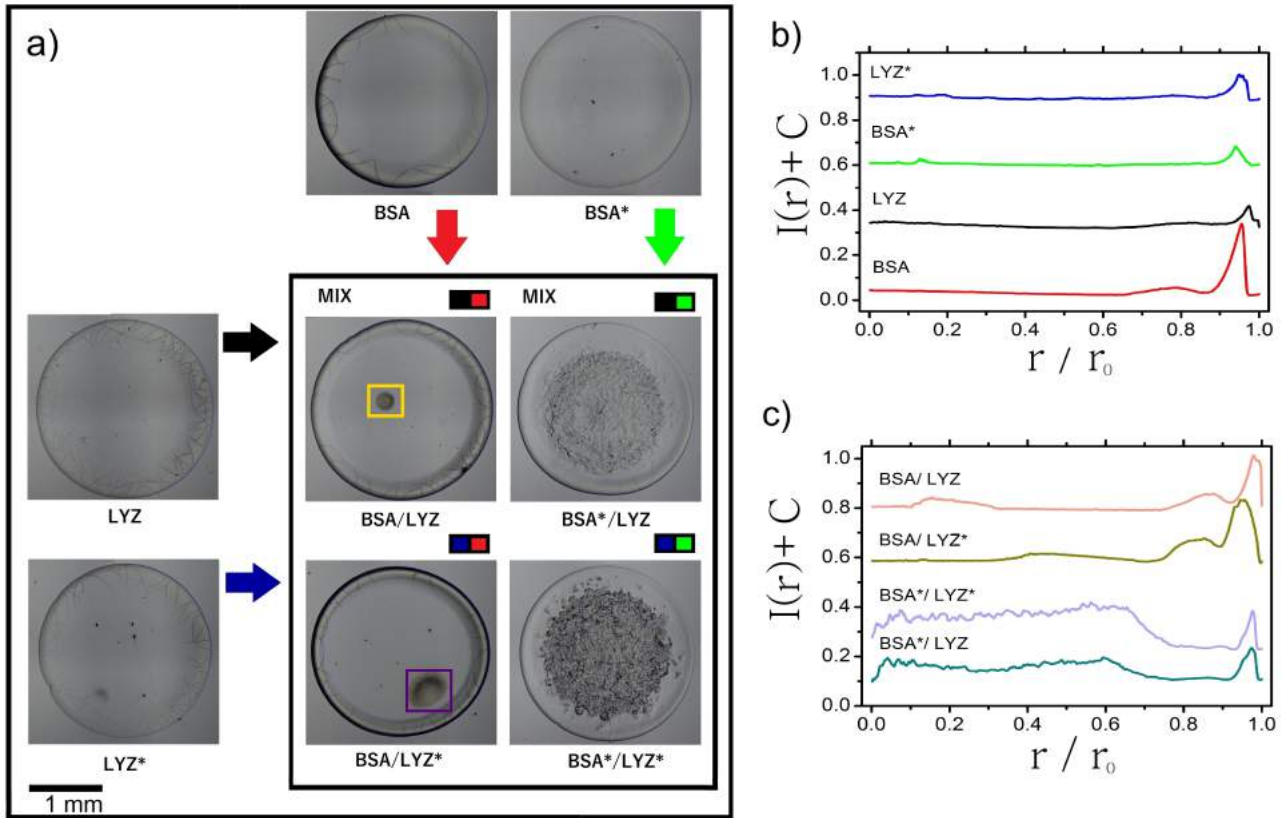


Figura 2.1: (a) Depósitos formados durante la evaporación de una gota que contiene uno y dos tipos de proteínas (a una concentración relativa $\phi_r = 50:50$, véase el cuadrado negro interior) sobre un sustrato a $T = 37^\circ C$ y $\phi = 1.6$ wt %. El color de las flechas indica el tipo de proteína (nativa o desnaturalizada) en la mezcla. La pequeña estructura circular y la cavidad se muestran en las pequeñas cajas amarillas y moradas, respectivamente. b) Perfil de densidad radial de los depósitos formados por una gota seca que contiene un tipo de proteína. c) Perfil de densidad radial de los depósitos de mezclas de proteínas. Las curvas fueron separadas por una constante para apreciar sus diferencias.

2.2.1. Efecto de la concentración de proteína en la formación del patrón

Analizamos la formación de depósitos a diferentes concentraciones relativas de proteínas $\phi_r = A/B$, donde A y B son moléculas de proteína de BSA y lisozima en la solución, respectivamente. Aquí, un valor pequeño de ϕ_r representa una alta concentración de lisozima, mientras que un valor alto implica abundancia de BSA. La Fig. 2.2a muestra los depósitos

formados para seis valores de $\phi_r=0.01, 0.07, 0.21, 1, 10.3, 100$. La formación de las pequeñas estructuras circulares aparece sólo en dos concentraciones relativas ($\phi_r= 0.07$ y 0.21). Claramente, altas concentraciones de lisozima producen grietas en el centro de los depósitos, mientras que el resto de ellos sólo presentan grietas en el anillo. El perfil de densidad radial de los depósitos correspondientes de la Fig. 2.2a se muestra en la Fig. 2.2b. Los depósitos de lisozima muestran grietas en toda la superficie. Las fracturas se correlacionan con los pequeños picos en el $I(r)$. Otro cambio visible en los depósitos es la forma y el tamaño de los anillos. En la Fig. 2.2c se muestra el radio normalizado del anillo γ en función de ϕ_r . Curiosamente, a $\phi_r= 1$ se observa la formación del anillo de café más estrecho y mejor definido. La naturaleza de los cambios en el anillo de café y la formación de grietas en las mezclas binarias de proteínas se discutirán más adelante, véase la Sección 2.2.2.

Sorprendentemente, las pequeñas estructuras circulares conforman diferentes morfologías con las mismas condiciones físicas. Forman grupos de cristales, ramas onduladas y cadenas de cristales desordenadas (véase la Fig. 2.3a). La correspondiente $I(r)$ de las estructuras de la Fig. 2.3a se representa en la Fig. 2.3b. Los pequeños picos de $I(r)$ representan agregados, ramas o cadenas de cristales. El pico grande de $I(r)$ corresponde a una región densa de cristales al final de la estructura circular. Observamos que la región central de algunas estructuras circulares es similar a los aglomerados formados por el algoritmo de agregación limitada por difusión (DLA), que describe el crecimiento dendrítico en el límite de baja concentración de partículas y agregación lenta [97]. Este algoritmo explora la agregación de partículas no interactivas en un espacio bidimensional. En general, la dimensión fractal de masa $D = 1.71$ caracteriza los aspectos morfológicos de los aglomerados DLA de acuerdo con m/r_D , donde m es la masa contenida en un cuadrado del lado r . De manera similar, describimos aspectos geométricos y topológicos de las estructuras circulares. La Fig. 2.3c muestra el número promedio de píxeles en función de r de las imágenes correspondientes de la Fig. 2.3a. La dimensión fractal de masa de mayor valor corresponde a la imagen A ($D = 1,77$), y E muestra la menor valor ($D = 1,62$). Encontramos que el grado de orden de las estructuras circulares aumenta con la masa (ver el recuadro de la Fig. 2.3c). Esto se debe a que la inhomogeneidad disminuye a medida que se agregan más proteínas en los grupos.

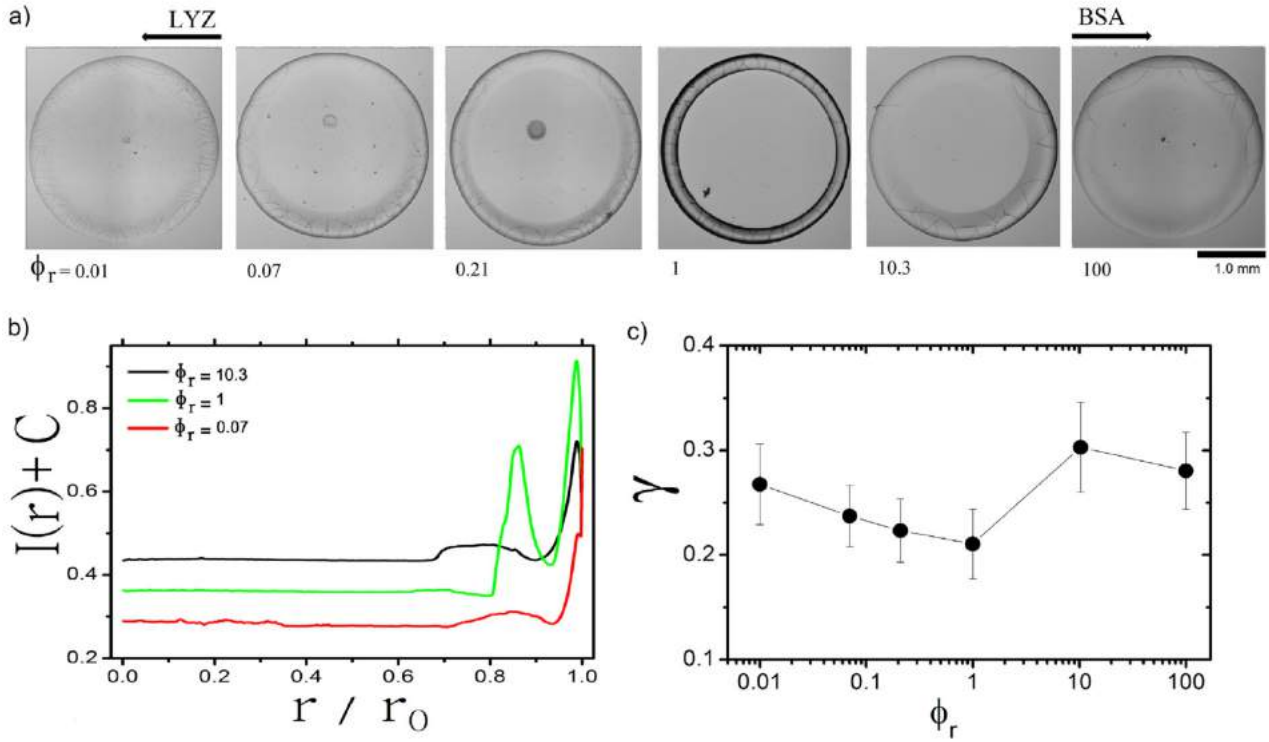


Figura 2.2: Formación de patrones a diferentes concentraciones relativas. (a) Gotas secas de una serie de suspensiones de proteínas a diferentes a $\phi_r = 0.01, 0.07, 0.21, 1, 10.3, 100$. La flecha negra indica la dirección en la que aumenta la concentración de cada proteína. b) El perfil de densidad radial de los depósitos formados por gotas que contienen una mezcla de proteínas a $\phi_r = 10.3, 1, 0.07$. Las curvas están separadas por una constante para apreciar sus diferencias. (c) El radio normalizado del anillo de café γ en función de ϕ_r . Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de $n = 10$.

Exploramos la formación de patrones a diferentes concentraciones de proteínas. La Fig. 2.4a muestra los patrones proteicos de lisozima, BSA y mezclas de soluciones a concentraciones $\phi = 0.4-2.0$ wt%. Los depósitos son radialmente simétricos con superficies interiores lisas, grietas espaciadas en el borde, y un “anillo de café” bien definido. Debemos notar que, mientras el ancho del anillo y las zonas de agrietamiento de los patrones de BSA aumentan a medida que aumenta la concentración, el ancho del anillo de los depósitos de lisozima no lo hacen. Todos los patrones de las mezclas presentan características morfológicas similares a las de los depósitos de BSA. La pequeña estructura compleja en la zona central

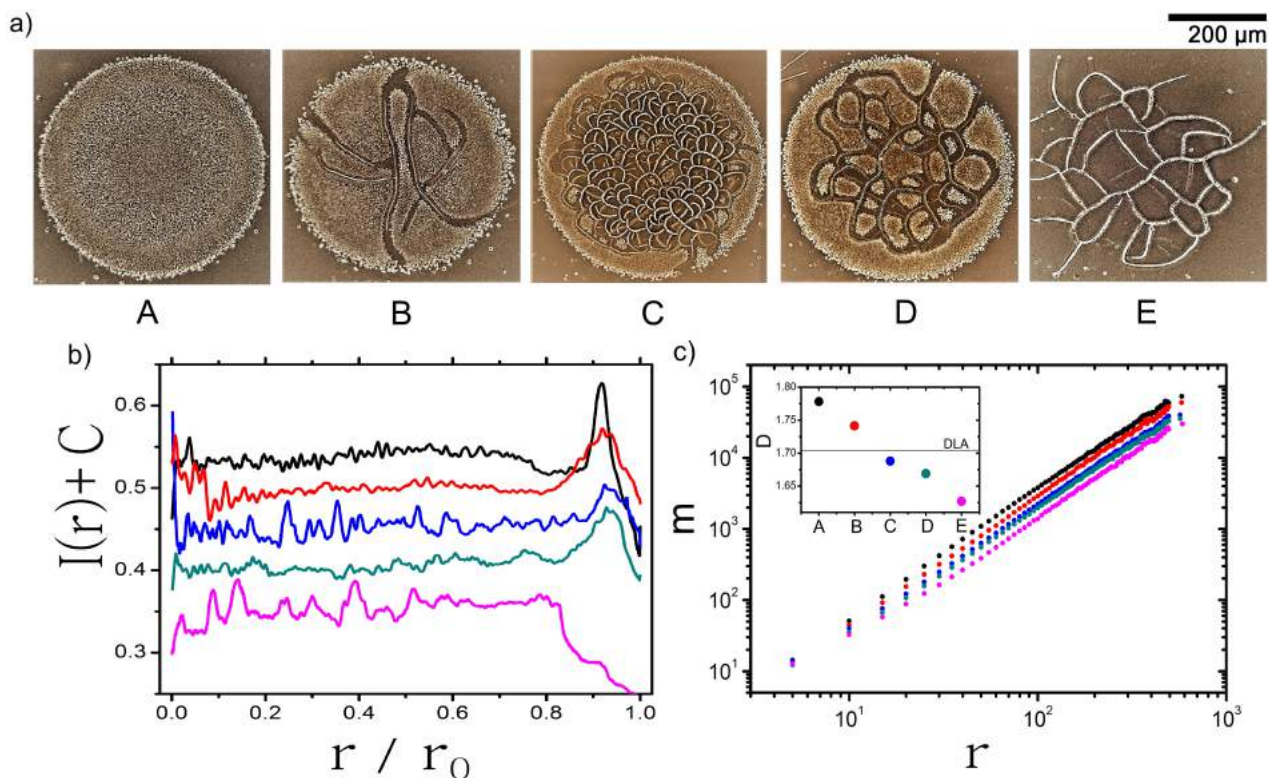


Figura 2.3: Estructuras circulares. a) Estructuras circulares formadas por gotas secas a $\phi = 1.6$ wt% y $T = 37^\circ C$. (b) Perfil de densidad radial de las estructuras correspondientes en (a). Las curvas están separadas por una constante para apreciar sus diferencias. c) La masa promedio en función de r para las estructuras correspondientes en (a). Inset: las dimensiones fractales. Gráfica $\log - \log$ del número promedio de píxeles m relacionados con los agregados de proteínas en relación con el radio de giro r tomado en diferentes lugares para las estructuras correspondientes de (a).

de los depósitos aparece en patrones formados a altas concentraciones de proteína (1.6 y 2.0wt%). Hay que destacar que estas estructuras tienen características similares: ramas dendríticas que están rodeadas de pequeños cristales. Finalmente, encontramos que el radio normalizado del anillo γ aumenta en función de ϕ para cualquier solución proteica, ver Fig. 2.4b. Esto significa que, independientemente de la concentración de la mezcla de proteínas, surgen mecanismos de transporte y procesos de agregación similares, que dan lugar al anillo de café.

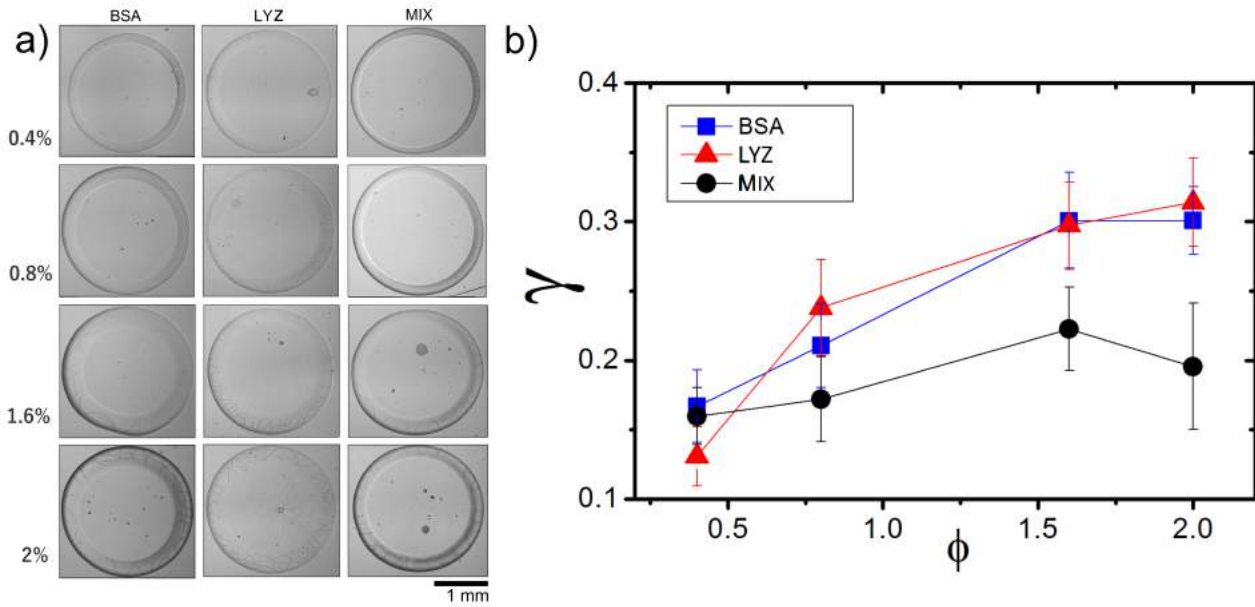


Figura 2.4: Efecto de la concentración de proteínas. (a) Los patrones formados durante la evaporación de una gota compuesta por dos tipos de proteínas a una concentración relativa $\phi_r = 50:50$ y $\phi = 1.6$ wt %. (b) El radio normalizado del anillo de café γ en función de ϕ . Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de $n = 10$.

2.2.2. Formación de patrones de soluciones de mezclas de proteínas

La morfología de la película de una solución de mezclas de proteínas es consecuencia de la competencia entre la gelificación y la cinética de desecación [67]. Una evaporación más rápida en el borde de la gota produce un flujo radial que aumenta la concentración de proteínas generando un efecto de anillo de café [71, 72, 109], ver Fig. 2.5a y b. Después de esto, el proceso de gelificación forma un borde. El fluido (en forma de domo) se desplaza hacia el interior de la gota mientras aparecen patrones de grietas en la periferia del anillo (Fig. 2.5c y d). En esta etapa también puede aparecer una superficie granulosa. Finalmente, el residuo de la solución binaria genera una estructura circular compleja en el centro del depósito (Fig. 2.5e y f).

Los agregados resultantes de proteínas en un medio acuoso son más probables que surjan de intermediarios específicos parcialmente plegados (proteínas parcialmente desplegadas)

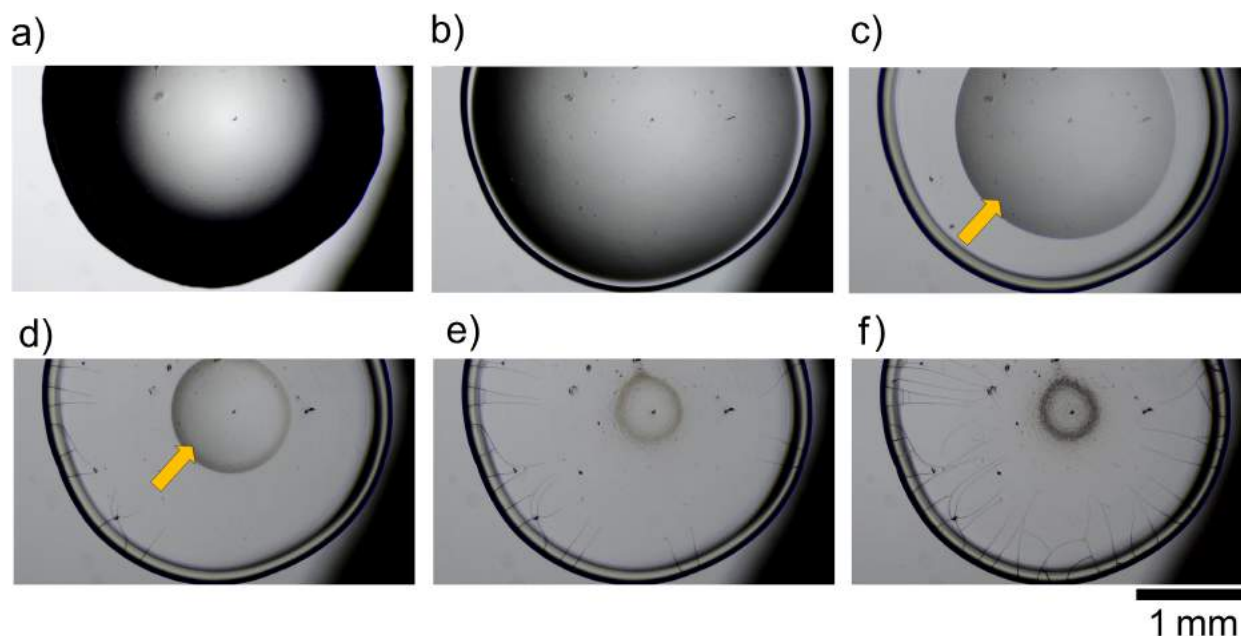


Figura 2.5: Formación de películas. Imágenes secuenciales del proceso de evaporación de gotas de BSA-lisozima* ($T = 37^{\circ}\text{C}$, $\phi_r = 50:50$ y $\phi = 1.6$ wt %) en diferentes momentos: a) la evaporación de la gota comienza a $t = 0$ s, (b) la formación del anillo de café a $t = 18.6$ s, (c) el fluido, en forma de domo, se mueve hacia el interior de la gota ($t = 147.6$ s). La flecha indica el movimiento del fluido. (d) Los patrones de grietas aparecen en la periferia del anillo mientras el fluido continúa moviéndose hacia el centro del depósito ($t = 153.6$ s). La formación de la estructura circular compleja a (e) $t = 186$ y (f) 195.6 s.

[110, 111, 112] y proteínas en estado desnaturalizado (proteínas totalmente desplegadas) [113]. La agregación de esta última ocurre cuando las cadenas hidrofóbicas laterales de una proteína desplegada se distribuyen aleatoriamente en pequeñas subunidades estructurales, que interactúan intermolecularmente con otras subunidades de superficies hidrofóbicas de moléculas vecinas formando pequeños grupos [113]. Cabe señalar que los intermediarios parcialmente desplegados forman grandes fracciones contiguas de superficies hidrofóbicas que se conectan con otras. Por lo tanto, estos son más propensos a agregarse que las proteínas completamente desplegadas.

Las proteínas parcial o totalmente desplegadas exponen sus partes hidrofóbicas generando agregados entre proteínas. Si una proteína de menor tamaño interviene durante este proceso, queda atrapada dentro de estas interacciones, resultando en la formación de agregados

complejos. Este fenómeno podría explicar la formación de depósitos en la solución que contiene una mezcla de moléculas de BSA y lisozima, donde el tamaño de esta última es cuatro veces menor. De este modo, la interacción de las subunidades hidrofóbicas de las proteínas BSA* domina sobre las de lisozima, siendo esta última el agente que queda atrapado como impureza. Por lo tanto, en la Fig. 2.1a. se puede observar un claro aumento de la rugosidad del depósito BSA*-LYZ*. De hecho, este efecto es evidente al observar los depósitos de BSA*-LYZ, donde la rugosidad es ligeramente menor debido a que la lisozima en estado nativo se involucra en menor medida (es decir, menos de estas moléculas están atrapadas en el proceso de agregación). Hay que tener en cuenta que los depósitos de BSA-LYZ* no muestran rugosidad. Esto se debe a que las moléculas de BSA son cuatro veces más grandes que las de la lisozima, lo que permite el proceso de libre agregación forme depósitos simples.

La formación de las pequeñas estructuras circulares en el último proceso de evaporación de las soluciones de BSA-LYZ podría entenderse utilizando una analogía con la transición vítrea [114]. Este esquema propone que la creación de agregados desordenados surge en la agregación súbita, como ocurre en la última etapa de evaporación de la gota. En esta etapa, las proteínas no pueden explorar en relativa libertad todo el espacio fase. Esta rápida agregación de las proteínas permite la formación de diferentes estructuras desordenadas en las mismas condiciones físicas, como se puede ver en la Fig. 2.3.

La formación del anillo de café más estrecho y mejor definido a $\phi_r = 1$ (ver Fig. 2.2) se explica por la competencia entre los flujos capilares (impulsados por la continuidad) y los flujos Marangoni (impulsados por los gradientes de tensión superficial) [70] que aparecen en las primeras etapas de la evaporación de la gota. Durante este proceso, los flujos capilares se mueven radialmente hacia afuera para compensar la pérdida de masa debido a la evaporación de las moléculas de agua que ocurre principalmente en el borde de la gota. De hecho, este mecanismo de transporte generó el llamado “efecto anillo de café” [71, 72, 109]. Los flujos de Marangoni, por otro lado, son producidos por surfactantes y gradientes de temperatura. Pueden detener el efecto del anillo de café forzando al fluido a circular hacia adentro en la gota [73, 74, 75, 76].

Las moléculas de proteínas de BSA y lisozima también tienen la capacidad de modificar la

tensión superficial de las soluciones acuosas [115]. Esto significa que cada proteína, en una gota, produce mayores flujos de Marangoni reduciendo el efecto del anillo de café, formando depósitos uniformes con una forma de anillo. Sin embargo, ya que la BSA tiene una carga neta negativa en agua pura y la lisozima una carga neta positiva, en una concentración relativa a $\phi_r=1$ la carga se neutraliza. En este escenario, el efecto de los flujos Marangoni disminuye, permitiendo la formación del anillo de café más estrecho y mejor definido a través de los flujos capilares.

En general, los patrones de grietas se forman cuando las tensiones producidas por la competencia entre la evaporación del disolvente y la adhesión del gel sobre el sustrato superan la resistencia del material. La Fig. 2.2a muestra que a altas concentraciones de lisozima aparecen grietas en toda la superficie de la película, mientras que en el resto de los depósitos se forman grietas en el anillo de café. La distribución específica de las grietas antes mencionada podría indicar que en los depósitos formados por BSA y lisozima, la mayoría de las moléculas de BSA están colocadas en el centro. Esto ocurre porque durante la evaporación de una gota, a pesar de que las moléculas de lisozima con bajo peso molecular pueden llegar primero al centro del depósito sobre el sustrato, estas son desplazadas por las moléculas de BSA relativamente más grandes, que llegan después (de forma similar al efecto Vroman [116]). Por lo tanto, con el aumento de la resistencia del depósito (como en los depósitos formados por BSA solamente), no se observa la formación de grietas en el centro.

Hay dos puntos importantes a destacar sobre la formación de patrones de mezclas de proteínas binarias. En primer lugar, proteínas con diferente estructura generan diferentes interacciones intermoleculares. En segundo lugar, estas interacciones intermoleculares dan lugar a procesos de agregación específicos que generan patrones con características únicas. Este hallazgo podría ser útil para revelar la presencia de una proteína en soluciones acuosas, en su estado plegado o desplegado, así como los cambios estructurales en las proteínas. Estudios similares sobre la evaporación de gotas que contienen biomoléculas han demostrado que las interacciones específicas generan depósitos de patrones con características distintivas [117, 118, 119, 120, 121]. Recientemente, se han utilizado partículas de poliestireno cargadas mezcladas con proteínas (BSA y hemoglobina) para analizar los cambios en los patrones de

las gotas evaporadas [122]. Una línea de razonamiento similar podría utilizarse para revelar la presencia de una proteína en una solución mediante la interacción específica con otra proteína de diferente tipo o estructura.

2.3. Conclusiones

En este estudio se analizó el efecto de la interacción entre proteínas con diferente estructura sobre la formación del patrón reminiscente de la evaporación de gotas examinadas mediante el uso de microscopio óptico. En la región central de los patrones, los depósitos muestran las diferencias estructurales más notorias. Observamos la formación de pequeños agregados cristalinos, estructuras dendríticas, ramas onduladas y cadenas entrelazadas; así como la creación de cavidades y una región áspera que cubre el centro de la película. Resulta interesante que, la adición de sales en la solución no es necesaria para la formación de tales agregados complejos contrario a lo que se ha reportado. También, encontramos que el tamaño del anillo de café aumenta con la concentración de proteínas. Analizamos las formaciones de patrones a diferentes concentraciones relativas y encontramos que el anillo de café más estrecho y mejor definido aparece a una concentración relativa de 1:1.

En general, la evaporación de una gota que contiene dos proteínas diferentes es impulsada por sus interacciones moleculares que finalmente generan patrones con características complejas. Este importante resultado sugiere que la presencia de fenómenos emergentes dentro de una gota derivan de la interacción de proteínas con diferentes estructuras. Por lo tanto, para una mejor comprensión de la formación de depósitos de biofluidos complejos, es necesario entender la formación de películas de mezclas de multicomponentes.

Los resultados obtenidos de esta sección están contenidos en un artículo cuyo título es “Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water”, que fue publicado en la revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* en 2018 [123].

3

Efecto de la re-hidratación de películas de proteínas

Estudiar las interrelaciones entre la capa de hidratación y la movilidad relativa de las diferentes regiones de las macromoléculas permiten avances considerables en el entendimiento de distintos procesos. Entre ellos podemos mencionar la pérdida de la actividad enzimática y la funcionalidad de las proteínas [124], la transición de fase en el conjunto de lípidos [125] y el cambio en las propiedades físicas de las melaninas [126], en condiciones de deshidratación extrema.

Los espectros infrarrojos de proteínas parcialmente hidratadas son una rica fuente de información tanto para conocer el estado de las moléculas de agua que interactúan con las proteínas, como de la proteína misma [127]. Esto debido a la gran sensibilidad de los modos vibracionales en los enlaces de hidrógeno [42]. Los pioneros en el estudio de la hidratación en proteínas globulares utilizando la espectroscopia infrarroja, fueron Buontempo y colaboradores [128]. Ellos analizaron espectros de películas de proteínas antes y después de un proceso de deshidratación. Los autores encontraron que las bandas amidas A y B están fuertemente influenciadas por moléculas de agua ligadas a la proteína. Además, observaron una intensa banda alrededor de 3300 cm^{-1} que es atribuida a estiramientos -NH, y una contribución en 3450 cm^{-1} que es atribuida al estiramiento -OH del agua. Su estudio evidenció

la presencia de moléculas de agua que interactúan entre sí y con la superficie de la proteína, en la región $3300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, siendo posible distinguir una contribución debida al agua líquida y al agua estrechamente ligada.

Más recientemente, Bridelli [129] estudió la hidratación en películas de proteínas, globulares y fibrosas, cambiando las condiciones de humedad relativa. Concluyó que la privación del agua en proteínas induce su reordenamiento estructural por su interacción intrínseca con el agua. Esto conduce a la reestructuración local de la molécula y a una modificación en la exposición de los grupos de cadenas laterales. El primer efecto, representado por la banda de estiramiento -OH, afecta al segundo, controlado por cambios en la región de las huellas dactilares ($1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$). Bridelli observó que a medida que aumentaba la hidratación, en ambos tipos de proteínas, la intensidad del espectro IR aumentaba en la región de estiramiento -OH ($4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) y ocurría de forma contraria al deshidratar las proteínas. La autora realizó una descomposición del contorno del espectro en sub-bandas Gaussianas en la región de estiramiento OH, y la correlacionó con la red de enlaces de hidrógeno alrededor de la proteína. Tanto en la proteína fibrosa (colágeno) como en la globular (lisozima), encontró más de una clase de moléculas de agua que interactúa íntimamente o no con la macromolécula. El primer componente de las sub-bandas gaussianas apunta a altos número de onda ($\sim 3500\text{ cm}^{-1}$), éste está asociado a moléculas de agua localizadas en la capa externa de la coraza de hidratación que recubre la proteína. La segunda clase alcanzan un punto máximo en números de onda intermedios ($\sim 3400\text{-}3290\text{ cm}^{-1}$) y se identifica con moléculas de agua que interactúan directamente con la cadena principal de las proteínas, actuando como puentes de agua dentro de la cadena peptídica y/o interconectando las diferentes cadenas. El último componente representado con una ancha sub-banda Gaussiana ($\sim 3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) expone una amplia configuración de estados de vibración del agua. Estas son atribuidas a moléculas de agua localizadas cerca de la superficie de la proteína y al hidrógeno unido a los grupos polares y cargados expuestos a la superficie de la macromolécula. También, se relaciona con moléculas de agua que interactúan con otras moléculas de agua vecinas que han sido absorbidas.

La rehidratación directa de películas formadas de la evaporación de gotas ha sido

explotada para la preparación de soluciones de liposomas e incluso para generar estrategias para el diagnóstico. Por ejemplo, E. Oropeza-Guzmán et al. [130] desarrollaron un método simple para formar liposomas depositando directamente gotas de agua sobre depósitos de gliserofosfolípidos. Por otra parte, R. Hernández-Perez et al. [131] depositaron gotas de diferentes soluciones en diferentes instantes, con el objetivo de realizar bioensayos en un dispositivo que aprovecha el mezclado que surge durante la evaporación de gotas. Si bien, el proceso de rehidratación directa de películas es muy prometedor, hasta ahora no se conoce cómo este proceso afecta tanto las características morfológicas de los depósitos complejos como la estructura interna de sus bio-componentes.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Preparación de proteínas

Se utilizaron albúmina de suero bovino (BSA)(Sigma-Aldrich, A2153), cloruro de litio (LiCl), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) y cloruro de cesio (CsCl) de alta pureza para preparar soluciones stock. Estos compuestos se disolvieron en agua desionizada (Mili-Q, R=18.2 MΩcm) a una concentración de 2.00 wt % a 25°C. Las soluciones stock de proteínas y diferentes sales, fueron diluidas de acuerdo con la concentración de proteína ($\phi_p = 1\text{wt } \%$) y sal ($\phi = 0.01\text{-}1\text{ wt } \%$) deseada. Las soluciones se almacenaron a 2°C y antes de su deposición se termalizaron a temperatura ambiente.

3.1.2. Fabricación de películas de proteínas

Para el análisis con espectroscopía infrarroja, las gotas de las soluciones se colocaron en una ventana de ZnSe utilizando una micropipeta; el volumen de las gotas fue de 10 μL . Su evaporación se llevó a cabo bajo condiciones ambientales controladas: $T = 25^\circ\text{C}$ a humedad relativa del 55 %. Para cada solución se fabricaron 4 películas.

3.1.3. Proceso de re-hidratación en películas de proteínas

Un ciclo de rehidratación directa consiste en suspender gotas de $10 \mu\text{L}$ de agua desionizada sobre las películas de BSA generadas por una gota del mismo volumen. Durante este proceso las proteínas absorbidas al sustrato se hidratan y disuelven en la gota. El tiempo de evaporación y adquisición del espectro, de películas, para cada ciclo es de 2 hrs. Una representación esquemática de los ciclos de hidratación directa se muestra en la Fig. 3.1.

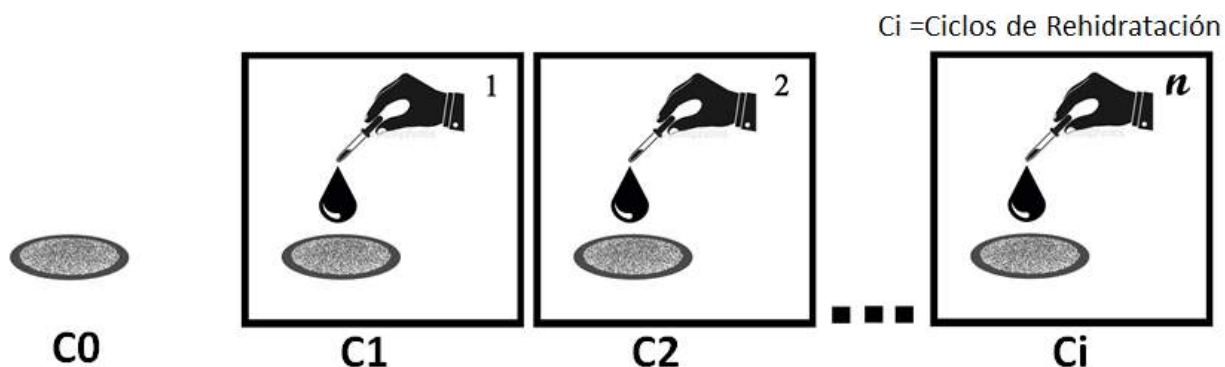


Figura 3.1: Representación esquemática de los ciclos de re-hidratación directa sobre las películas de proteínas.

3.1.4. Mediciones por FTIR

Los espectros de IR fueron medidos con el equipo Jasco FT/IR-4700. Las películas de proteínas se colocaron en un lente invisible al infrarrojo (ZnSe) y posterior al proceso de re-hidratación se colocaron en un soporte para su medición. Para cada espectro, se midió un interferograma de 66 barridos con una resolución de 4cm^{-1} en la región 4000 a 600cm^{-1} . Este proceso se repitió 5 veces para cada muestra. En un experimento separado, se midió el espectro del lente sin muestra como espectro de referencia en condiciones idénticas.

3.1.5. Análisis de espectros

Los espectros se analizaron en el programa OriginLab, versión 2016. A cada espectro se le realizó una corrección de la línea base y posteriormente se le sustrajo el espectro de referencia.

Los espectros diferenciados resultantes se suavizaron con una función Savitsky-Golay de siete puntos [132] para eliminar el posible ruido blanco.

3.1.6. Diferencia máxima relativa de absorbancia

Para comparar la absorbancia a diferentes intervalos de números de onda donde el espectro brinde información relevante acerca de la estructura de las proteínas, definimos la absorbancia máxima relativa de la siguiente manera:

$$\delta Abs_i = \frac{(A_i - B_i)}{B_i}, \quad (3.1)$$

donde A y B son los valores máximos de la absorbancia en el intervalo de número de onda i .

3.2. Resultados y discusión

En la Fig. 3.2a se muestra la absorbancia como función del número de onda para 4 ciclos de rehidratación de películas formadas por soluciones de BSA ($\phi_p=1$ wt %) libres de sal. La hidratación directa incrementa la intensidad de absorbancia de las películas. Un acercamiento donde se aprecia claramente este efecto se muestra en la Fig. 3.3b. El aumento de intensidad del espectro en la región $4000-3000\text{ cm}^{-1}$ indica el incremento de la vibración de enlaces -OH y -NH (amida A). Esta región es asociada con tres tipos de moléculas de agua: (1) moléculas de agua localizadas en la capa externa de la coraza de hidratación que recubre la proteína, (2) moléculas de agua ligadas y (3) moléculas de agua localizadas cerca de la superficie de la proteína, y al hidrógeno unido a los grupos polares y cargados expuestos a la superficie de la macromolécula.

La absorbancia en la región Amida I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) surge principalmente de estiramientos C=O de la cadena principal y de estructuras helicoidales α . Por lo tanto, un incremento en la intensidad de estos enlaces significa que la proteína se está estabilizando. Por otra parte, la Fig. 3.2c muestra que los ciclos de rehidratación directa no afectan

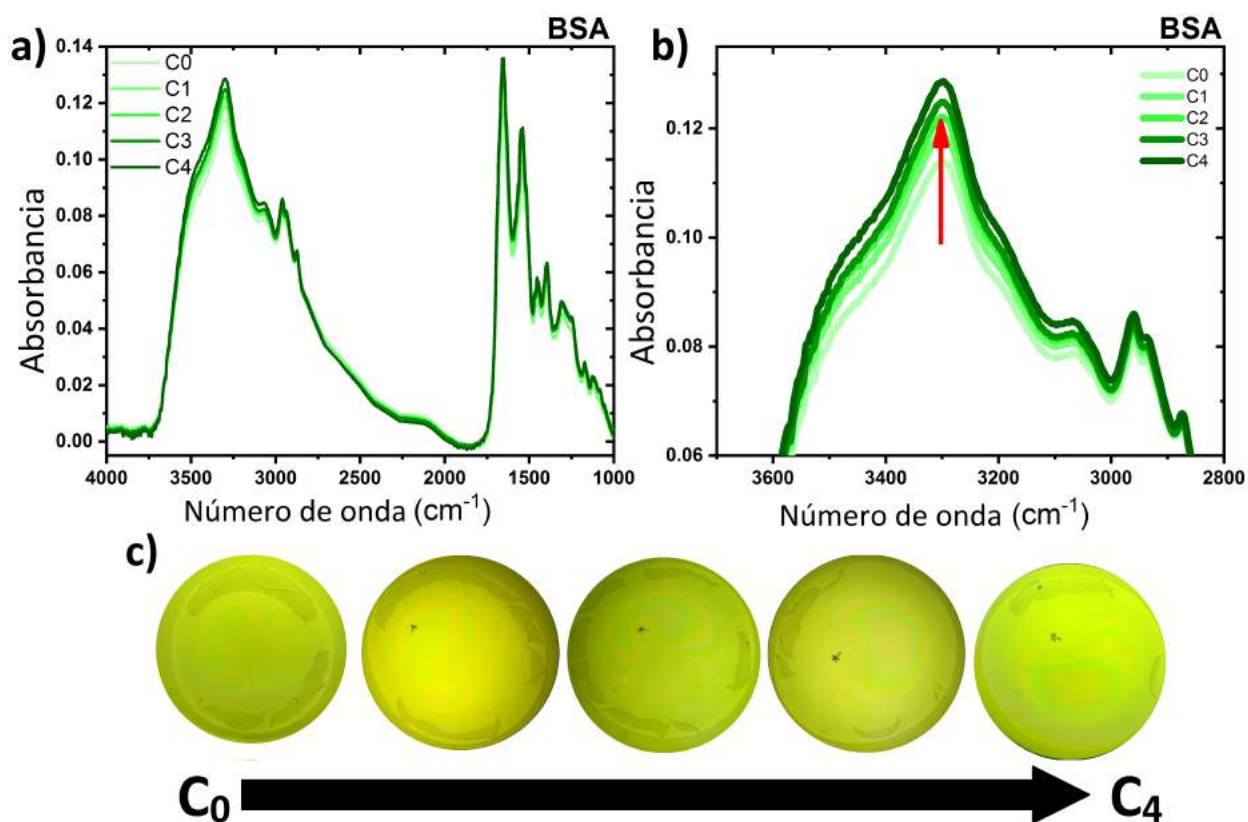


Figura 3.2: Espectros IR de películas de proteínas libres de sal. En (a) se muestra la absorbancia como función del número de onda para cuatro ciclos de rehidratación de películas formadas por soluciones de BSA ($\phi_p=1$ wt %). (b) Acercamiento de (a) en la región $3600-2800\text{ cm}^{-1}$. (c) Películas de BSA para los diferentes ciclos de hidratación.

significativamente la morfología de las películas de proteínas.

Para cuantificar el incremento de la absorbancia como función de los ciclos de rehidratación, estimamos la absorbancia máxima relativa para intervalos de número de onda de relevancia (de $32999-3297\text{ cm}^{-1}$ y $1658-1650\text{ cm}^{-1}$, respectivamente), ver Fig. 3.3. Claramente, los ciclos de rehidratación incrementan la intensidad de la absorbancia. Resulta interesante que depósitos sin hidratar directamente pierden absorbancia. Esto significa que el número de enlaces OH/ NH y C=O disminuye (Fig. 3.3a y 3.3b, respectivamente), implicando que hay una disminución en el número de moléculas de agua que interactúan con la proteína, y que este proceso de deshidratación toma lugar en escalas temporales largas. Además, esto

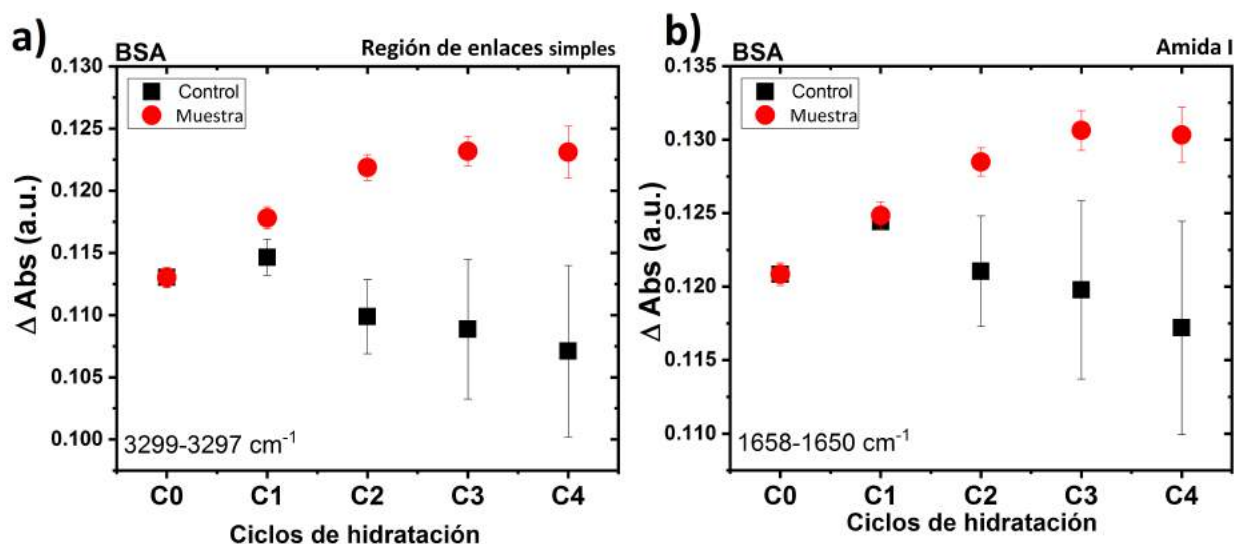


Figura 3.3: Se muestra el caso de películas re-hidratadas y películas control (sin hidratación) en las regiones de (a) enlace simple y (b) amida I. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de $n = 4$.

significa que hay una pérdida de helices α en la estructura de proteína, por lo que ésta pierde estabilidad.

También exploramos el efecto de re-hidratación de películas de BSA con sales, ver Fig. 3.4. La absorbancia como función del número de onda para 4 ciclos de rehidratación de películas de proteínas con NaCl ($\phi_p=1$ wt % y $\phi=0.10$ wt %, respectivamente) se muestra en la Fig. 3.4a. La Fig. 3.4b muestra un acercamiento de la absorbancia dentro de la región de 3800-2800 cm^{-1} . Encontramos que, a diferencia de los depósitos de proteínas libres de sal, en las películas de proteínas con sal no hay una hidratación progresiva, la intensidad en la absorbancia puede aumentar o disminuir sin importar el número de ciclos. Una posible explicación para este fenómeno yace sobre la compleja competencia de asociación del agua entre las proteínas y iones, donde los iones de cloro y sodio pueden inhibir o no los nuevos enlaces de agua con la proteína. Molecularmente esto puede indicar que los ciclos de hidratación permiten un reordenamiento de la capa de contraiones alrededor de las proteínas compitiendo de alguna forma con la coraza de hidratación de la proteína. Resulta interesante que a pesar de que en el interior de las películas hay una formación de agregados complejos, después de cada ciclo

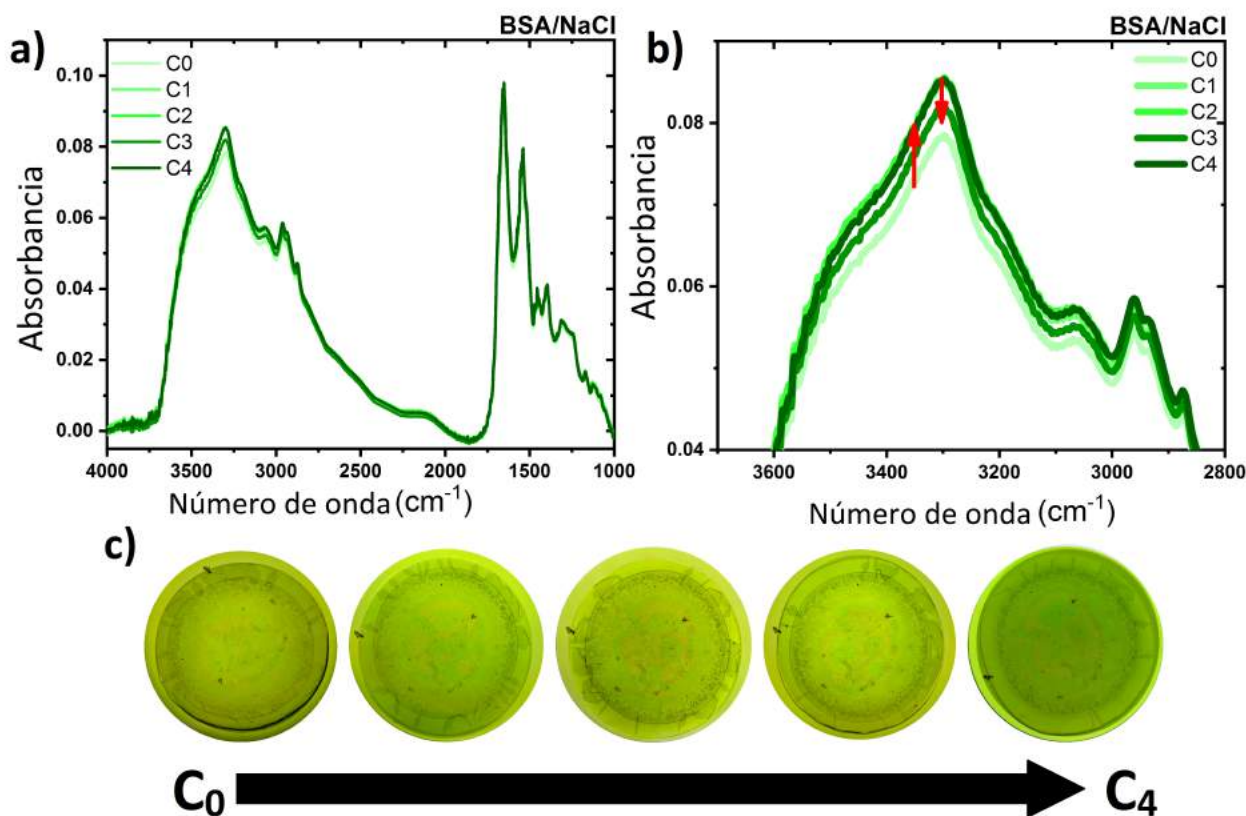


Figura 3.4: Espectros IR de películas de proteínas con NaCl. En (a) se muestra la absorbancia como función del número de onda para cuatro ciclos de rehidratación de películas formadas por soluciones de BSA ($\phi_p=1$ wt %) y NaCl ($\phi=0.10$ wt %). (b) Acercamiento de (a) en la región $3600-2800$ cm^{-1} . (c) Películas de BSA/NaCl para los diferentes ciclos de hidratación.

de re-hidratación directa, la morfología de los depósitos es semejante, ver Fig. 3.4c.

La Fig. 3.5 muestra la absorbancia máxima relativa para intervalos de número de onda de relevancia. Claramente, tanto en la región de enlaces simples como la banda amida I, (Fig. 3.5a y 3.5b, respectivamente), no hay diferencias significativas entre los ciclos de rehidratación. Sin embargo, nuevamente observamos que los depósitos sin hidratar directamente pierden absorbancia, significando que el número de enlaces OH/ NH y C=O disminuye.

Para conocer el efecto de la concentración de sales sobre la rehidratación de películas de proteínas realizamos experimentos con cuatro concentraciones de NaCl. En Fig. 3.6a se muestran las estructuras generadas después de un ciclo de rehidratación directa a diferente

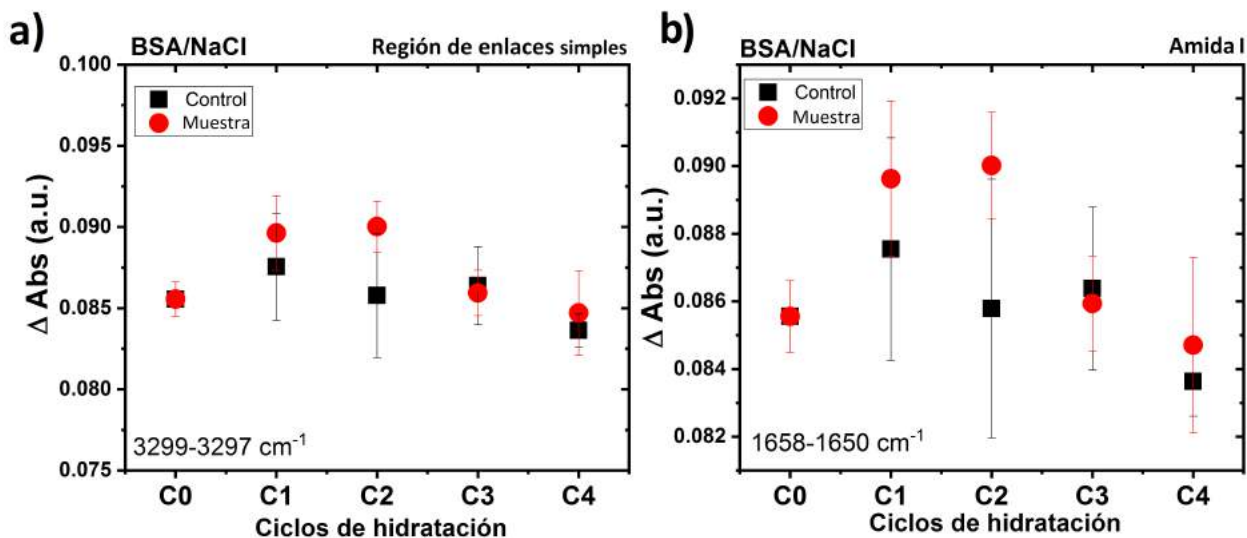


Figura 3.5: Se muestra el caso de películas de BSA/NaCl (re-hidratadas) y películas control (sin hidratación) en las regiones de (a) enlace simple y (b) amida I. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de $n = 4$

concentración. A simple vista se observa que el número y la complejidad de los agregados dentro de los depósitos incrementa con la concentración. Además, el ciclo de rehidratación no induce cambios morfológicos significativos. Encontramos que la absorbancia decrece conforme aumenta la concentración de NaCl, ver Fig. 3.6b. Esto significa que la capa de contra-iones alrededor de las proteínas es cada vez más densa impidiendo la interacción de las moléculas de agua con las proteínas aún después de un ciclo de rehidratación. Además, al aumentar la concentración de sal, algunas de las moléculas de agua pueden ser atraídas por los iones, lo que disminuye el número de moléculas de agua disponibles para interactuar con las proteínas.

Para escudriñar el papel de los iones en el proceso de hidratación directa, realizamos experimentos comparando el efecto de cuatro diferentes sales dentro de soluciones de BSA. En la Fig. 3.7a se muestra que las películas generadas después de un ciclo de rehidratación directa para cuatro soluciones conteniendo diferentes cationes, en donde no se observan cambios morfológicos significativos. En la Fig. 3.7b se observan los correspondientes espectros de las películas de la Fig. 3.7a. Observamos que la forma de los espectros es similar para todas las películas a excepción del cloruro de litio (LiCl), donde además la intensidad de absorbancia

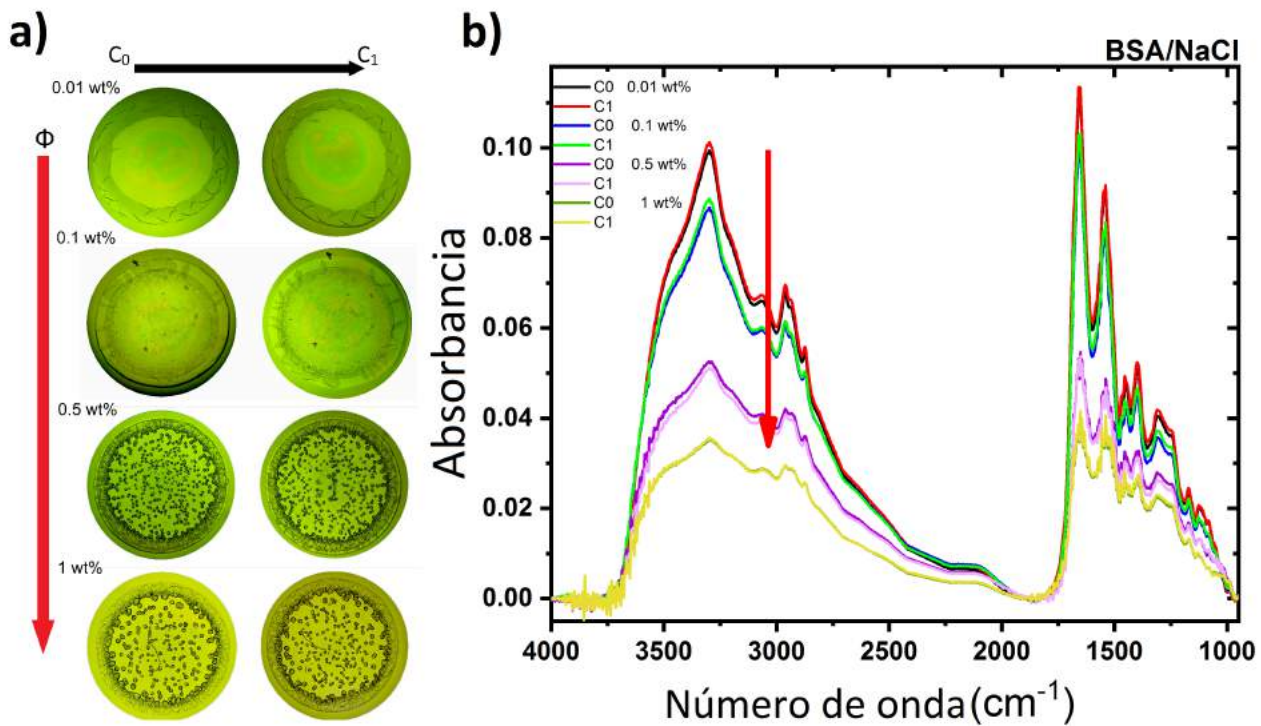


Figura 3.6: Efecto de la concentración de NaCl. (a) Películas formadas de la evaporación de soluciones de BSA ($\phi_p=1 \text{ wt\%}$) con diferente concentración de NaCl ($\phi=0.01-1 \text{ wt\%}$). (b) Absorbancia como función del número de onda para distintas concentraciones de NaCl.

es mayor. El aumento en la absorbancia del CsCl, con respecto a las sales con iones de Na y K, sugiere que el Cs permite una mayor hidratación en las películas. La forma y tamaño del espectro del LiCl no solo es indicativo de una mayor hidratación sino que además, este ión permite la participación de nuevos modos de vibración en relación con las moléculas de agua. Esto es debido a que el litio (el catión con menor radio iónico) tiene una mayor fuerza de interacción electrostática con las moléculas de agua, interrumpiendo y modificando los enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua y moléculas de agua-proteína, generando una distribución anisotrópica de moléculas de agua. En el modelo de Collins (“concepto de igualdad de afinidades de agua”) los iones se consideran como una esfera con una carga puntual en el centro. Cuando los iones son pequeños, las moléculas de agua circundantes están fuertemente unidas (los iones son duros o kosmotrópicos), mientras que cuando los iones son de mayor tamaño, la capa de hidratación está unida débilmente (los iones son

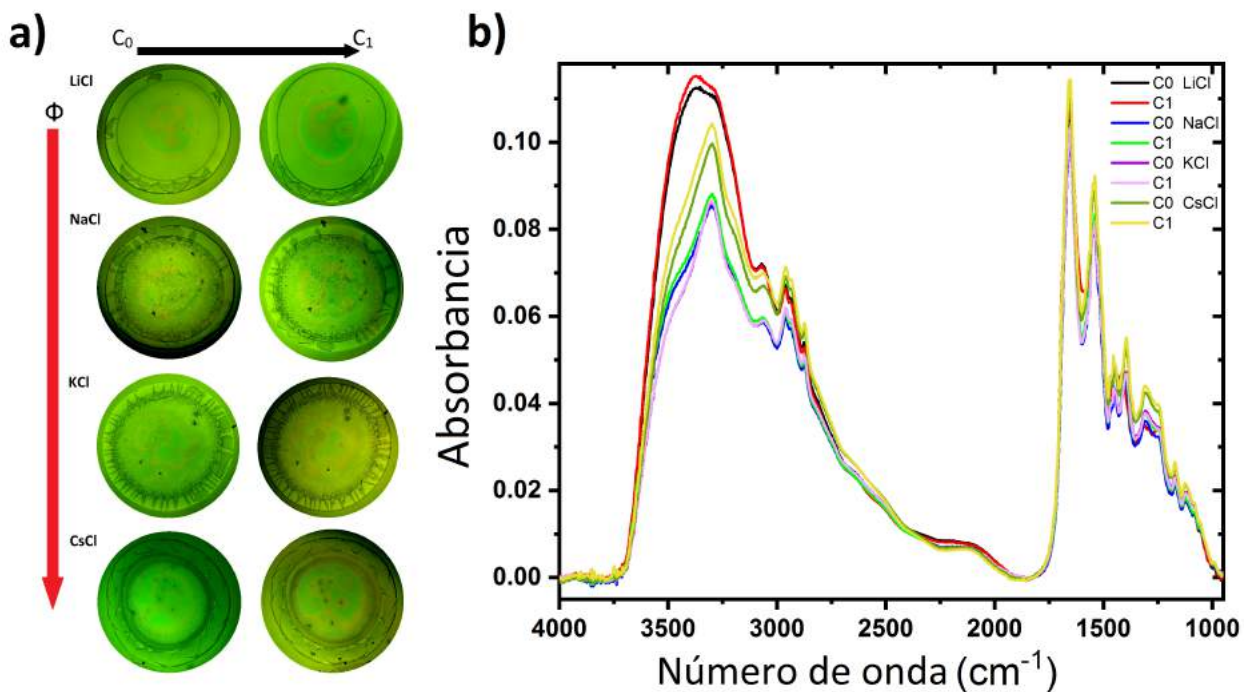


Figura 3.7: Efecto de diferentes iones sobre la re-hidratación de BSA. (a) Películas de BSA ($\phi_p=1$ wt %) con diferentes sales: LiCl, NaCl, KCl y CsCl ($\phi=0.10$ wt %). (b) Absorbancia como función del número de onda para distintas sales.

suaves o caotrópicos). La discriminación entre ambos tipos proviene de la fuerza relativa de las interacciones ion-agua en comparación con las interacciones agua-agua.

3.3. Conclusiones

En conclusión, realizamos un estudio sobre el efecto de la re-hidratación directa de depósitos de proteínas. Encontramos que es posible asociar cambios conformacionales inducidos por re-hidratación en películas de proteínas, por sus espectros de IR. Además, la re-hidratación de las películas establece interacciones íntimas de moléculas de agua con las proteínas. Por otra parte, los ciclos de rehidratación de películas de proteínas con sales influyen de forma aleatoria sobre la interacción agua-proteína. Finalmente, encontramos que los depósitos formados por bajas concentraciones de diferentes iones son macroscópicamente semejantes y no diferenciables, pero que estos pueden ser claramente clasificables utilizando los espectros de

absorbancia. En el contexto de diagnóstico de enfermedades, a través del análisis de depósitos de biofluidos, este resultado sugiere el uso de técnicas complementarias para diferenciar entre los componentes de soluciones.

4

Efecto de tratamientos térmicos sobre la estructura de la BSA

Los tratamientos térmicos son procesos fundamentales tanto en la producción de concentrados de proteína de suero, como en el procesamiento de productos alimenticios. Sin embargo, estos pueden afectar la estructura y las propiedades de las proteínas de manera irreversible. Durante los tratamientos térmicos, pequeños reordenamientos estructurales cubren un amplio rango de distancias y escalas de tiempo que varían desde femtosegundos a microsegundos [36]. Los pequeños movimientos dependen de las fluctuaciones térmicas y permiten que las proteínas alcancen estados energéticamente más favorables (estado plegado) [133]. Cambios abruptos en la temperatura pueden inducir grandes cambios estructurales y conducir a un proceso de desnaturalización en proteínas, tanto hidratadas como anhidras [34]. Si estos cambios son irreversibles, se induce una reducción en la solubilidad de la proteína, la cual, influye sobre las propiedades de emulsificación, espumación y gelificación en sistemas alimenticios [134]. Dependiendo de la temperatura y del contenido de agua, las proteínas, ya sea en estado nativo o desnaturalizadas, pueden estar en un fase altamente elástica o rígida [35].

Aunque la desnaturalización térmica de compuestos orgánicos tiene gran relevancia en la industria alimenticia, se ha optado por estudiar los efectos generados por ésta en sistemas modelo [32, 135, 136, 137]. Esto debido a la gran complejidad para encontrar la dependencia

de las observables físicas respecto a los parámetros de control que están involucrados en los complejos mecanismos de transporte de calor. Para atacar este problema se ha mostrado que el estudio de proteínas séricas es un buen punto de partida. El efecto del tratamiento térmico sobre la estructura y funcionalidad de estas proteínas está asociado a la destrucción de algunas fuerzas estabilizadoras como los enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas y otros enlaces no covalentes [33]. El rompimiento de estas fuerzas conduce a las proteínas a una nueva configuración que puede limitarse a un segmento de proteína [138] o involucrar a toda la molécula (“todo o nada”)[133]. Hardy [139] clasificó, por primera vez a este proceso en dos etapas. La primera, la desnaturalización, implica una alteración no covalente de la proteína, mientras que, en la segunda la agregación de proteínas desplegadas puede conducir a la precipitación, coagulación y/o gelificación. En esta etapa los enlaces covalentes de la proteína pueden romperse y provocar una degradación térmica siempre que la energía aplicada sobre la proteína sea excesiva [137].

La albúmina sérica bovina (BSA) es una de las proteínas séricas globulares mayormente utilizadas como sistema modelo. La razón es que tiene acciones antimicrobianas, antivirales, estimula el sistema inmunológico, la actividad anticancerígena y otras características metabólicas. La BSA tiene una masa molecular de 66.5 kDa, conformada por 583 aminoácidos y presenta estructuras secundarias y terciarias bien definidas susceptibles a procesos de desnaturalización [140]. Para la BSA, el mecanismo de agregación está compuesto por un despliegue parcial de su estructura terciaria y la disminución de las hélices α y espirales aleatorias (“random coil”) seguidos por el surgimiento de agregados de láminas β [141, 142, 143]. Su estructura secundaria no contiene hojas beta y se ha estimado que está compuesta por un 67% de hélices (formado por 385 residuos de aminoácidos), 10% giros y 23% de cadenas extendidas [144, 145, 146, 147]. En su desnaturalización térmica se ha encontrado que su helicidad comienza a disminuir a temperaturas superiores a 30°C [147]. A 45°C, la helicidad de la proteína disminuye al 61% y se recupera completamente después de su enfriamiento a 25°C [147]. Bajo esta condición, la desnaturalización térmica es reversible a temperaturas menores de 50°C, pero no a temperaturas superiores [147, 148, 149, 150]. Cuanto mayor es la temperatura de desnaturalización, el porcentaje de helicidad recuperada

es menor. A 60°C su desnaturalización avanza y comienza la formación de los agregados β [148, 149, 150]. A 65°C la porción estructural de las hélices y agregados β son de 44 % y 13 %, respectivamente. A 100°C su helicidad es de 22 %, esto significa que los restos helicoidales de ~ 128 aminoácidos todavía se mantienen a esta temperatura [151].

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ha servido como una herramienta útil para estudiar los cambios de las estructuras secundarias, cadenas laterales y desnaturalización de proteínas. Las frecuencias, intensidades y anchos de banda características de un espectro IR de proteína, permite observar cambios conformacionales como los que ocurren en los grupos COOH y COO [152, 153]. También se han estudiado los cambios conformacionales y estructurales involucrados en los procesos de agregación térmica en soluciones de proteínas. Estos procesos pueden describirse en un modelo de dos estados: el elemento estructural secundario (hélice α o lámina β) disminuye en función de la temperatura concomitantemente con el surgimiento de agregados intermoleculares de hoja β [65, 154].

En la literatura científica se encuentran diversos trabajos que reportan estudios sobre la desnaturalización térmica de proteínas tratadas térmicamente a través de precalentamiento, esterilización y pasteurización [141]. Sin embargo, hasta ahora, no se sabe cómo el número de ciclos de calentamiento y enfriamiento lento (recocidos) afecta la estructura de las proteínas. De hecho, también se desconoce si estos tratamientos podrían llevar a las proteínas a estados energéticamente más estables, como ocurre en cualquier estructura vítrea recocida, o bien, llevar a las proteínas a un estado irreversible de desnaturalización. Por lo tanto, una mayor comprensión del efecto de los recocidos podría permitir un mayor control sobre las propiedades funcionales de las proteínas.

En este capítulo presentamos un estudio que compara el efecto de tratamientos térmicos con diferente número de recocido sobre la estructura de la BSA. Tales procesos tienen tres ingredientes principales: (1) cada tratamiento térmico tiene diferente número de recocido, (2) cada recocido tiene diferente duración, y principalmente (3) el tiempo total de contacto térmico entre la fuente térmica y el sistema (tiempo de permanencia) es el mismo para cada tratamiento.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Preparación de proteínas

Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA)(Sigma-Aldrich, A2153) de alta pureza para preparar una solución stock. La BSA se disolvió en agua desionizada (Mili-Q, R=18.2 MΩcm) a una concentración de 1.00 *wt* % a 25°C. Las soluciones se almacenaron a 2°C y antes de su deposición se termalizaron a temperatura ambiente.

4.1.2. Tratamiento térmico en soluciones de proteínas

Aplicamos 3 tratamientos térmicos a las soluciones de BSA: El primero de ellos (T1) consiste en calentar la solución de proteína a la temperatura deseada por 10 min. El segundo (T2), consiste en calentar 2 veces la solución a la temperatura deseada durante 5 min con un tiempo de espera entre cada calentamiento de 20 min. El tercero (T3), consiste en calentar 4 veces la solución a la temperatura deseada durante 2.5 min con un tiempo de espera entre cada calentamiento de 20 min. Debemos remarcar que, el tiempo total en el que la solución está en contacto térmico con la fuente es de 10 min para cada tratamiento térmico. Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo para $T = 37, 50, 70$ y 90°C . Una representación esquemática de los tratamientos térmicos se muestra en la Fig. 4.1.

4.1.3. Fabricación de películas de proteínas

Las gotas de las soluciones, que previamente recibieron un tratamiento térmico, se colocaron en una ventana de ZnSe utilizando una micropipeta; el volumen de las gotas fue de 10 μL . Las gotas se evaporaron bajo condiciones ambientales controladas: $T = 25^{\circ}\text{C}$ a humedad relativa del 26 %. Para cada solución se fabricaron 4 películas.

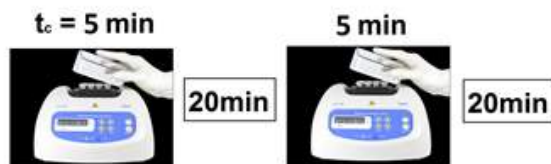
4.1.4. Mediciones por FTIR

Los espectros de IR fueron medidos con el equipo Jasco FT/IR-4700. Las películas de BSA se colocaron en un lente invisible al infrarrojo (ZnSe) y posteriormente se pusieron en un

T1, T = 90°C



T2, T = 90°C



T3, T = 90°C

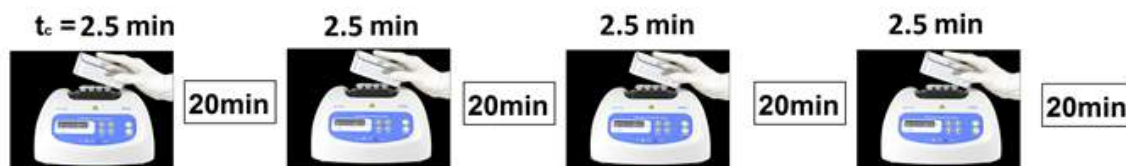


Figura 4.1: Representación esquemática de los tratamientos térmicos.

soporte para su medición. Para cada espectro, se midió un interferograma de 66 barridos con una resolución de 4cm^{-1} en la región 4000 a 600cm^{-1} . Este proceso se repitió 5 veces para cada muestra. En un experimento separado, se midió el espectro del lente sin muestra como espectro de referencia en condiciones idénticas.

4.1.5. Análisis de espectros

Los espectros se analizaron en el programa OriginLab versión 2016. A cada espectro se le realizó una corrección de la línea base y posteriormente se le sustrajo el espectro de referencia. Los espectros diferenciados resultantes se suavizaron con una función Savitsky-Golay de siete puntos [132] para eliminar el posible ruido blanco.

4.1.6. Diferencia máxima relativa de absorbancia

Para comparar la absorbancia a diferentes intervalos de números de onda donde el espectro brinde información relevante acerca de la estructura de las proteínas, definimos la absorbancia máxima relativa de la siguiente manera:

$$\Delta Abs_i = \frac{(A_i - B_i)}{B_i}, \quad (4.1)$$

donde A y B son los valores máximos de la absorbancia en el intervalo de número de onda i .

4.2. Resultados y discusión

La Fig. 4.2 muestra la absorbancia como función del número de onda para los tres tratamientos térmicos a diferente temperatura. Encontramos que por debajo de $50^\circ C$ no hay cambios significativos en la morfología y la intensidad de los espectros para los diferentes tratamientos térmicos. Esto es debido a que la estructura de la BSA es reversible por debajo de $50^\circ C$. Sin embargo, el mayor cambio se observa a $90^\circ C$. Resulta interesante que la diferencia incrementa con el número de veces en que la solución estuvo en contacto térmico con la fuente. Es decir, el efecto se hace más evidente para T3 a pesar de que el tiempo total en contacto térmico con la fuente, es el mismo. Una posible explicación para este fenómeno es que en cada recocado, los enlaces de la proteína son desplazados de mínimos profundos de energía a mínimos locales, generando estructuras menos estables.

La Fig. 4.3 muestra la absorbancia máxima relativa de los espectros de proteínas en la banda amida A ($\sim 3310-3270 \text{ cm}^{-1}$) para los diferentes tratamientos térmicos a diferentes temperaturas. Esta gráfica de absorbancia nos da información acerca de las moléculas de agua que interactúan con las proteínas a través de los enlaces N-H y OH. Los enlaces N-H se relacionan con las moléculas de agua ligadas en estos sitios como consecuencia de la desnaturalización de la proteína, mientras que los enlaces OH, están relacionados con la interacción de las moléculas de agua con la cadena principal debido al desdoblamiento de la

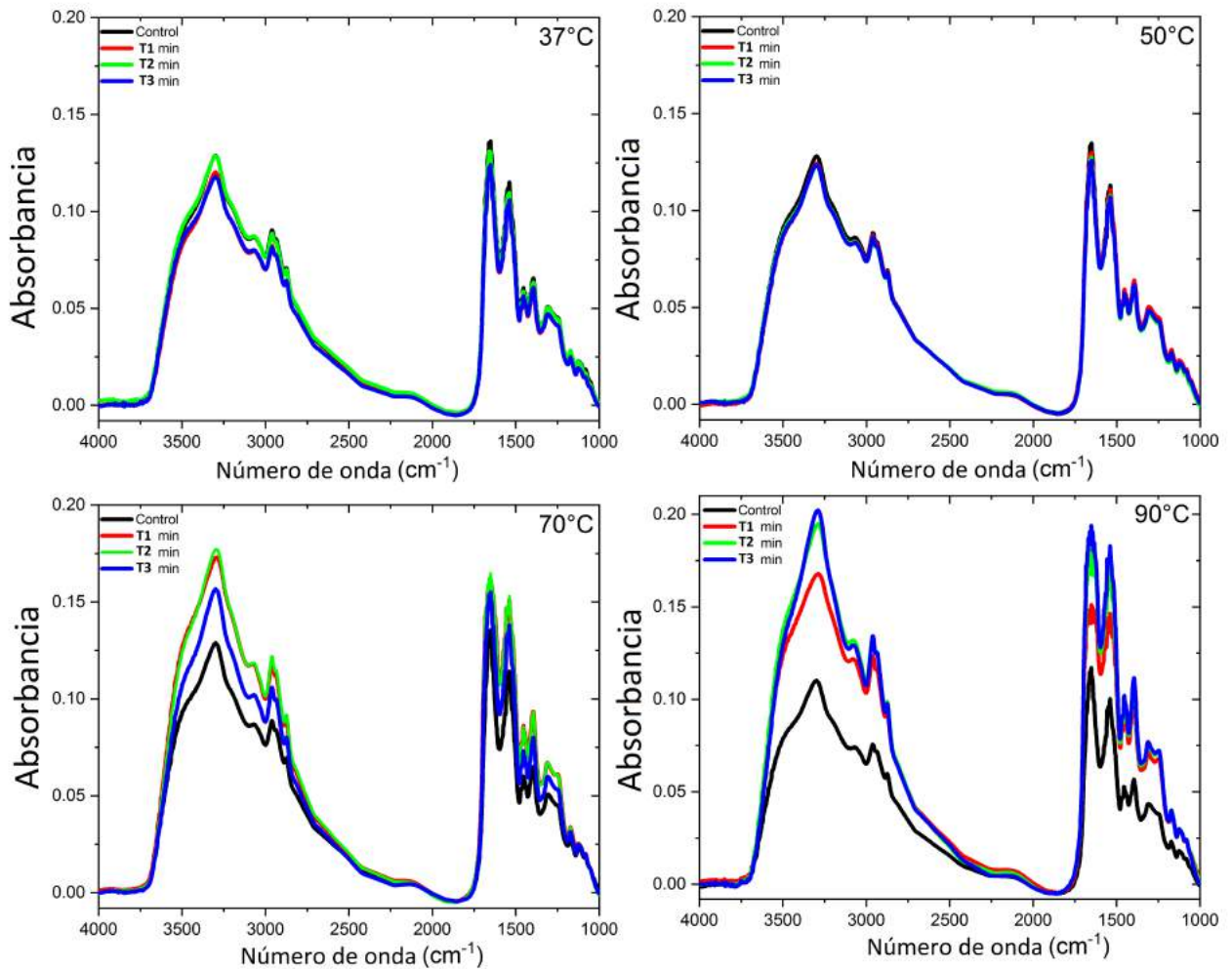


Figura 4.2: Absorbancia en función del número de onda. En la imagen se muestra la absorbancia de películas de BSA como función del número de onda para los tres tratamientos térmicos a diferente temperatura.

proteína. Un incremento en la absorbancia indica un incremento en el número de enlaces.

Por debajo de 50°C no hay diferencias significativas para los valores máximos de absorbancia debido a que la proteína tiene una desnaturalización reversible por debajo de esta temperatura. Por arriba de ésta observamos un incremento en la absorbancia máxima relativa el cual se relaciona con la desnaturalización irreversible de la proteína. Resulta interesante que los tratamientos con un mayor número de recidos generan una mayor desnaturalización de la proteína. Esto a pesar de que el tiempo total de contacto térmico entre la fuente y el

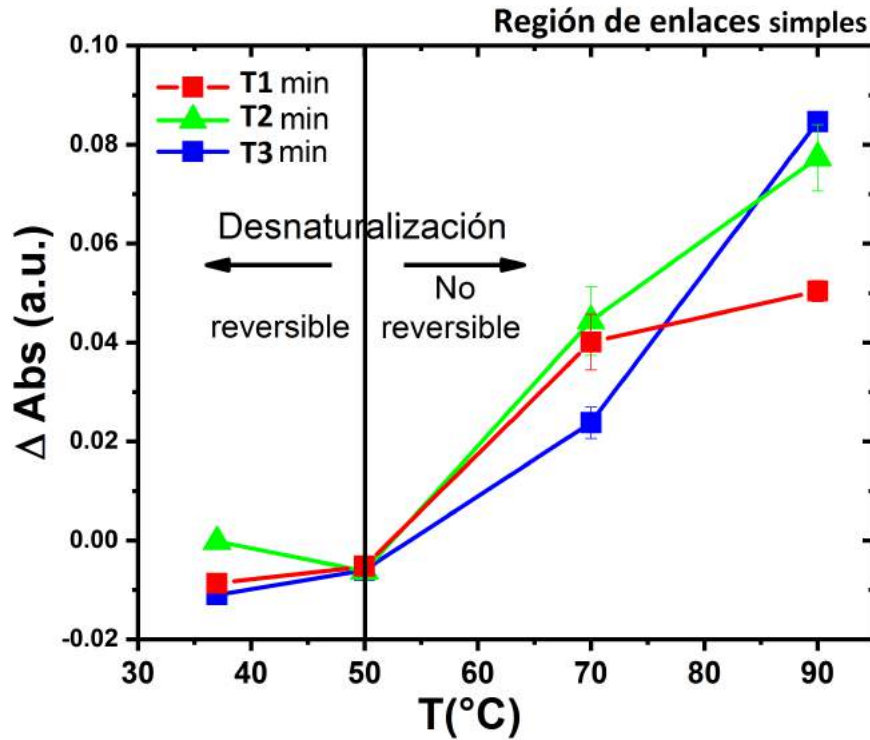


Figura 4.3: Absorbancia máxima relativa. En la imagen se muestra la absorbancia máxima relativa de los espectros de películas de BSA en la banda amida A para los diferentes tratamientos térmicos a diferentes temperaturas.

sistema es el mismo.

En la Fig. 4.4 se grafica la absorbancia máxima relativa en la banda Amida II ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$) para los diferentes tratamientos térmicos a diferentes temperaturas. Esta región nos da información acerca de la estructura de la cadena principal de las proteínas. El incremento en la absorbancia en 1538 cm^{-1} indica un aumento en la vibración de estiramiento C-N y N-H. Esto nos indica un cambio estructural en la cadena principal asociado a formaciones de hojas β , como típicamente ocurre en la desnaturalización de la BSA. Observamos que el incremento de la temperatura y el número de recocidos promueven la vibración de estiramientos C-N y N-H, es decir, favorecen la formación de hojas β . Por lo tanto, este comportamiento supondría que la porción estructural de hélices α (estructura nativa) pierde estabilidad simultáneamente. Nuevamente, por debajo de la temperatura de desnaturalización reversible no hay cambios

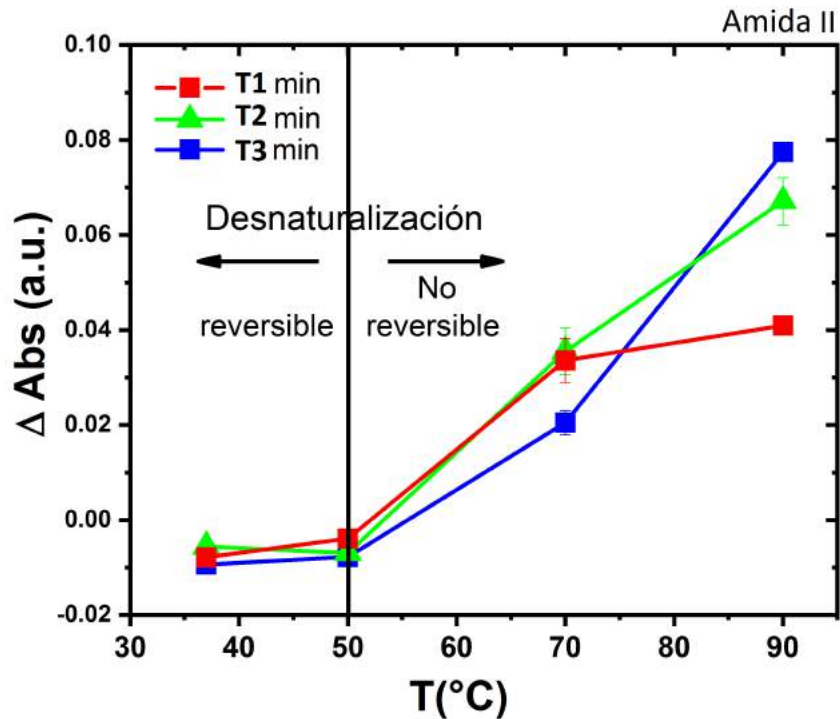


Figura 4.4: En la imagen se muestra la absorbancia máxima relativa en 1538 cm^{-1} para los diferentes tratamientos térmicos a diferentes temperaturas.

significativos, debido a que las estructuras secundarias de la proteína regresan a su forma nativa.

4.3. Conclusiones

En resumen, llevamos a cabo experimentos donde exploramos el efecto del número de recocidos sobre la estructura de la BSA. Una condición fundamental cumplen nuestros tratamientos: el tiempo total de contacto térmico entre la fuente térmica y el sistema es el mismo para cada tratamiento, sin importar el número de recocidos. Encontramos que, el número de recocidos no afecta la desnaturalización reversible de la proteína. Sin embargo, éste es un parámetro importante cuando la desnaturalización es irreversible ya que determina la formación de hojas β , la disminución de hélices α , el incremento de enlaces OH y N-H. Lo que

nos permite concluir que el número de recocidos afecta directamente el estado conformacional de la estructura secundaria de la proteína y la capa de hidratación alrededor de ella.

5

Conclusiones

En este trabajo se estudió la formación de patrones a partir de la evaporación de gotas de soluciones de proteínas (BSA y Lyz), así como el efecto de la rehidratación y de tratamientos térmicos sobre la estructura de las proteínas en tales agregados. De los resultados obtenidos y discutidos en los capítulos anteriores, las conclusiones generales son las siguientes:

- Los patrones complejos en películas de mezclas de proteínas (BSA y Lyz) libres de sales pueden servir como biomarcadores para detectar la presencia de proteínas de un bio-fluido (bajo ciertas condiciones de concentración).
- El análisis estructural de películas de proteínas (BSA y Lyz) puede servir para validar o desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico de enfermedades.
- El grosor del anillo de las películas indica si la diferencia de concentración relativa de proteínas ((BSA y Lyz) es pequeña.
- La espectroscopía infrarroja podría servir como una técnica auxiliar para detectar cambios en la estructura de las proteínas (BSA) en aquellas películas que son estructuralmente semejantes.
- Películas de proteínas (BSA) en ausencia de sales “capturan” moléculas de agua en cada ciclo de hidratación directa, mientras que la presencia de sales impide tal proceso.

- A pesar de que el tiempo total de contacto térmico entre una fuente y el sistema es el mismo, se genera un mayor cambio estructural en las proteínas que son sometidas a un mayor número de recocidos.

Bibliografía

- [1] B-J De Gans, Paul C Duineveld, and Ulrich S Schubert. Inkjet printing of polymers: state of the art and future developments. *Advanced materials*, 16(3):203–213, 2004.
- [2] Junggho Park and Joocho Moon. Control of colloidal particle deposit patterns within picoliter droplets ejected by ink-jet printing. *Langmuir*, 22(8):3506–3513, 2006.
- [3] Viral H Chhasatia and Ying Sun. Interaction of bi-dispersed particles with contact line in an evaporating colloidal drop. *Soft Matter*, 7(21):10135–10143, 2011.
- [4] Denong Wang, Shaoyi Liu, Brian J Trummer, Chao Deng, and Aili Wang. Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nature biotechnology*, 20(3):275, 2002.
- [5] Ralf Blossey and Andreas Bosio. Contact line deposits on cdna microarrays: a twin-spot effect. *Langmuir*, 18(7):2952–2954, 2002.
- [6] Vincent Dugas, Jérôme Broutin, and Eliane Souteyrand. Droplet evaporation study applied to dna chip manufacturing. *Langmuir*, 21(20):9130–9136, 2005.
- [7] Ivan I Smalyukh, Olena V Zribi, John C Butler, Oleg D Lavrentovich, and Gerard CL Wong. Structure and dynamics of liquid crystalline pattern formation in drying droplets of dna. *Physical review letters*, 96(17):177801, 2006.
- [8] Jorge González-Gutiérrez, Rosendo Pérez-Isidoro, and JC Ruiz-Suárez. A technique based on droplet evaporation to recognize alcoholic drinks. *Review of Scientific Instruments*, 88(7):074101, 2017.

- [9] James M Cameron, Holly J Butler, David S Palmer, and Matthew J Baker. Biofluid spectroscopic disease diagnostics: A review on the processes and spectral impact of drying. *Journal of biophotonics*, 11(4):e201700299, 2018.
- [10] TA Yakhno, OA Sedova, AG Sanin, and AS Pelyushenko. On the existence of regular structures in liquid human blood serum (plasma) and phase transitions in the course of its drying. *Technical Physics*, 48(4):399–403, 2003.
- [11] Tatiana A Yakhno, Anatoly G Sanin, Vladimir G Yakhno, Artem S Pelyushenko, Michael B Dowell, Christina Vacca, and Valentina A Goutorova. Drying drops of biological liquids: dynamics of the optical and mechanical properties. application in rapid medical diagnostics. In *Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III*, volume 5692, pages 188–199. International Society for Optics and Photonics, 2005.
- [12] E Rapis. A change in the physical state of a nonequilibrium blood plasma protein film in patients with carcinoma. *Technical Physics*, 47(4):510–512, 2002.
- [13] David Brutin, Benjamin Sobac, Boris Loquet, and José Sampaol. Pattern formation in drying drops of blood. *Journal of fluid mechanics*, 667:85–95, 2011.
- [14] L Pauchard, F Parisse, and C Allain. Influence of salt content on crack patterns formed through colloidal suspension desiccation. *Physical Review E*, 59(3):3737, 1999.
- [15] CC Annarelli, Jean Fornazero, Jacques Bert, and Jean Colombani. Crack patterns in drying protein solution drops. *The European Physical Journal E*, 5(1):599–603, 2001.
- [16] Guofang Chen and Gideon J Mohamed. Complex protein patterns formation via salt-induced self-assembly and droplet evaporation. *The European Physical Journal E*, 33(1):19–26, 2010.
- [17] Tatiana A Yakhno. Complex pattern formation in sessile droplets of protein-salt solutions with low protein content. what substance fabricates these patterns? *Physical Chemistry*, 1(1):10–13, 2011.

- [18] Heather Meloy Gorr, Joshua M Zueger, and John A Barnard. Characteristic size for onset of coffee-ring effect in evaporating lysozyme-water solution droplets. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(40):12213–12220, 2012.
- [19] Heather Meloy Gorr, Joshua M Zueger, Daniel R McAdams, and John A Barnard. Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:59–66, 2013.
- [20] Heather Meloy Gorr, Ziyi Xiong, and John A Barnard. Pattern recognition for identification of lysozyme droplet solution chemistry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115:170–175, 2014.
- [21] Gennadiy Glibitskiy, Dmitriy Glibitskiy, Olga Gorobchenko, Oleg Nikolov, Alexander Roshal, Mikhail Semenov, and Anatoliy Gasan. Textures on the surface of bsa films with different concentrations of sodium halides and water state in solution. *Nanoscale research letters*, 10(1):155, 2015.
- [22] Franck Bonnier, Matthew J Baker, and Hugh J Byrne. Vibrational spectroscopic analysis of body fluids: avoiding molecular contamination using centrifugal filtration. *Analytical Methods*, 6(14):5155–5160, 2014.
- [23] Hans Frauenfelder. *The physics of proteins: an introduction to biological physics and molecular biophysics*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [24] Roderick E Hubbard. Hydrogen bonds in proteins: role and strength. *eLS*, 2001.
- [25] George A Jeffrey and Wolfram Saenger. *Hydrogen bonding in biological structures*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [26] Marie-Claire Bellissent-Funel, Ali Hassanali, Martina Havenith, Richard Henchman, Peter Pohl, Fabio Sterpone, David van der Spoel, Yao Xu, and Angel E Garcia. Water determines the structure and dynamics of proteins. *Chemical reviews*, 116(13):7673–7697, 2016.

- [27] Douglas F Sticke, Leonard G Presta, Ken A Dill, and George D Rose. Hydrogen bonding in globular proteins. *Journal of molecular biology*, 226(4):1143–1159, 1992.
- [28] George D Rose and Richard Wolfenden. Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22(1):381–415, 1993.
- [29] George A Jeffrey and George A Jeffrey. *An introduction to hydrogen bonding*, volume 12. Oxford university press New York, 1997.
- [30] William D Arnold and Eric Oldfield. The chemical nature of hydrogen bonding in proteins via nmr: J-couplings, chemical shifts, and aim theory. *Journal of the American Chemical Society*, 122(51):12835–12841, 2000.
- [31] Tell Tuttle, Jürgen Gräfenstein, Anan Wu, Elfi Kraka, and Dieter Cremer. Analysis of the nmr spin- spin coupling mechanism across a h- bond: Nature of the h-bond in proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3):1115–1129, 2004.
- [32] P JELEN and W RATTRAY. Thermal denaturation of whey proteins. *Bulletin-International Dairy Federation*, (1):66–85, 1995.
- [33] Esra Ibanoglu. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chemistry*, 90(4):621–626, 2005.
- [34] JN De Wit. Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk and Dairy Journal (Netherlands)*, 1981.
- [35] IV Sochava. Heat capacity and thermodynamic characteristics of denaturation and glass transition of hydrated and anhydrous proteins. *Biophysical chemistry*, 69(1):31–41, 1997.
- [36] Dagmar Ringe and Gregory A Petsko. The glass transition in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it. *Biophysical chemistry*, 105(2-3):667–680, 2003.

- [37] Kálmán Tompa, M Bokor, Tamás Verebélyi, and Péter Tompa. Water rotation barriers on protein molecular surfaces. *Chemical Physics*, 448:15–25, 2015.
- [38] Peter L Privalov and Colyn Crane-Robinson. Role of water in the formation of macromolecular structures. *European Biophysics Journal*, 46(3):203–224, 2017.
- [39] Felix Franks. Protein stability: the value of old literature. *Biophysical chemistry*, 96(2-3):117–127, 2002.
- [40] Martin Chaplin. Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11):861, 2006.
- [41] Yutaka Maruyama and Yuichi Harano. Does water drive protein folding? *Chemical Physics Letters*, 581:85–90, 2013.
- [42] John A Rupley and Giorgio Careri. Protein hydration and function. In *Advances in protein chemistry*, volume 41, pages 37–172. Elsevier, 1991.
- [43] Walter Kauzmann. Some factors in the interpretation of protein denaturation1. In *Advances in protein chemistry*, volume 14, pages 1–63. Elsevier, 1959.
- [44] JL Finney, JM Goodfellow, and PL Poole. The structure and dynamics of water in globular proteins. In *Structural Molecular Biology*, pages 387–426. Springer, 1982.
- [45] ID Kuntz Jr and W Kauzmann. Hydration of proteins and polypeptides. In *Advances in protein chemistry*, volume 28, pages 239–345. Elsevier, 1974.
- [46] John A Rupley, Enrico Gratton, and Giorgio Careri. Water and globular proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(1):18–22, 1983.
- [47] John Tileston Edsall and Hugh A McKenzie. Water and proteins. ii. the location and dynamics of water in protein systems and its relation to their stability and properties. *Advances in biophysics*, 16:v–vi, 1983.

- [48] Matthew J Baker, Júlio Trevisan, Paul Bassan, Rohit Bhargava, Holly J Butler, Konrad M Dorling, Peter R Fielden, Simon W Fogarty, Nigel J Fullwood, Kelly A Heys, et al. Using fourier transform ir spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8):1771, 2014.
- [49] Huayan Yang, Shouning Yang, Jilie Kong, Aichun Dong, and Shaoning Yu. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using fourier transform ir spectroscopy. *Nature protocols*, 10(3):382, 2015.
- [50] David C Lee, James A Hayward, Colin J Restall, and Dennis Chapman. Second-derivative infrared spectroscopic studies of the secondary structures of bacteriorhodopsin and calcium-atpase. *Biochemistry*, 24(16):4364–4373, 1985.
- [51] Ziye Xiong. *Pattern Formation in Drying Drops of Colloidal Solutions*. PhD thesis, University of Pittsburgh, 2013.
- [52] R Anthony Shaw, Sarah Low-Ying, Angela Man, Kan-Zhi Liu, C Mansfield, Christopher B Rileg, and Mouchanoh Vijarnsorn. Infrared spectroscopy of biofluids in clinical chemistry and medical diagnostics. *Biomedical Vibrational Spectroscopy*, page 79, 2008.
- [53] Matthew J Baker, Shawn R Hussain, Lila Lovergne, Valérie Untereiner, Caryn Hughes, Roman A Lukaszewski, Gérard Thiéfin, and Ganesh D Sockalingum. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chemical Society Reviews*, 45(7):1803–1818, 2016.
- [54] Brian C Smith. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press, 2011.
- [55] Samuel Krimm and Jagdeesh Bandekar. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. In *Advances in protein chemistry*, volume 38, pages 181–364. Elsevier, 1986.

- [56] Witold K Surewicz, Henry H Mantsch, and Dennis Chapman. Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*, 32(2):389–394, 1993.
- [57] Michael Jackson and Henry H Mantsch. The use and misuse of ftir spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(2):95–120, 1995.
- [58] Heino Susi and D Michael Byler. [13] resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. In *Methods in enzymology*, volume 130, pages 290–311. Elsevier, 1986.
- [59] Witold K Surewicz and Henry H Mantsch. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 952:115–130, 1988.
- [60] F Siebert. [20] infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems. In *Methods in enzymology*, volume 246, pages 501–526. Elsevier, 1995.
- [61] Sangita Seshadri, Ritu Khurana, and Anthony L Fink. [36] fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits. In *Methods in enzymology*, volume 309, pages 559–576. Elsevier, 1999.
- [62] Parvez I Haris and Dennis Chapman. Does fourier-transform infrared spectroscopy provide useful information on protein structures? *Trends in biochemical sciences*, 17(9):328–333, 1992.
- [63] A Elliott and EJ Ambrose. Structure of synthetic polypeptides. *Nature*, 165(4206):921, 1950.
- [64] Yu N Chirgadze, EV Brazhnikov, and NA Nevskaya. Intramolecular distortion of the α -helical structure of polypeptides. *Journal of molecular biology*, 102(4):781–792, 1976.

- [65] Jilie Kong and Shaoning Yu. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8):549–559, 2007.
- [66] Tatiana Yakhno. Salt-induced protein phase transitions in drying drops. *Journal of colloid and interface science*, 318(2):225–230, 2008.
- [67] Heather Meloy Gorr, Joshua M Zueger, and John A Barnard. Lysozyme pattern formation in evaporating drops. *Langmuir*, 28(9):4039–4042, 2012.
- [68] Yurii Yurévich Tarasevich. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids. *Physics-Uspekh*, 47(7):717–728, 2004.
- [69] Pavlo Takhistov and Hsueh-Chia Chang. Complex stain morphologies. *Industrial & engineering chemistry research*, 41(25):6256–6269, 2002.
- [70] Hua Hu and Ronald G Larson. Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14):7090–7094, 2006.
- [71] Robert D Deegan, Olgica Bakajin, Todd F Dupont, Greb Huber, Sidney R Nagel, and Thomas A Witten. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389(6653):827, 1997.
- [72] Yongjoon Choi, Jeongin Han, and Chongyoun Kim. Pattern formation in drying of particle-laden sessile drops of polymer solutions on solid substrates. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(11):2130–2136, 2011.
- [73] Tim Still, Peter J Yunker, and Arjun G Yodh. Surfactant-induced marangoni eddies alter the coffee-rings of evaporating colloidal drops. *Langmuir*, 28(11):4984–4988, 2012.
- [74] Tadashi Kajiya, Wataru Kobayashi, Tohru Okuzono, and Masao Doi. Controlling the drying and film formation processes of polymer solution droplets with addition of small amount of surfactants. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(47):15460–15466, 2009.

- [75] Wouter Sempels, Raf De Dier, Hideaki Mizuno, Johan Hofkens, and Jan Vermant. Auto-production of biosurfactants reverses the coffee ring effect in a bacterial system. *Nature communications*, 4:1757, 2013.
- [76] Hyoungsoo Kim, François Boulogne, Eujin Um, Ian Jacobi, Ernie Button, and Howard A Stone. Controlled uniform coating from the interplay of marangoni flows and surface-adsorbed macromolecules. *Physical review letters*, 116(12):124501, 2016.
- [77] Annie Steinchen and Khellil Sefiane. Self-organised marangoni motion at evaporating drops or in capillary menisci—thermohydrodynamical model. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics*, 30(1):39–51, 2005.
- [78] Robert D Deegan, Olgica Bakajin, Todd F Dupont, Greg Huber, Sidney R Nagel, and Thomas A Witten. Contact line deposits in an evaporating drop. *Physical review E*, 62(1):756, 2000.
- [79] Tatiana A Yakhno, Vladimir G Yakhno, Anatoly G Sanin, Olga A Sanina, Artem S Pelyushenko, Natalia A Egorova, Igor G Terentiev, Svetlana V Smetanina, Olga V Korochkina, and Elena V Yashukova. The informative-capacity phenomenon of drying drops. *IEEE engineering in medicine and biology magazine*, 24(2):96–104, 2005.
- [80] W Bou Zeid and D Brutin. Influence of relative humidity on spreading, pattern formation and adhesion of a drying drop of whole blood. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 430:1–7, 2013.
- [81] Benjamin Sobac and David Brutin. Desiccation of a sessile drop of blood: cracks, folds formation and delamination. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 448:34–44, 2014.
- [82] Jorge González-Gutiérrez, Rosendo Pérez-Isidoro, MI Pérez-Camacho, and JC Ruiz-Suárez. The calorimetric properties of liposomes determine the morphology of dried droplets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155:215–222, 2017.

- [83] Nikolai D Denkov, Orlin Dimitrov Velev, PA Kralchevsky, IB Ivanov, H Yoshimura, and Kuniaki Nagayama. Two-dimensional crystallization [6]. *Nature*, 361(6407):26, 1993.
- [84] Hua Hu and Ronald G Larson. Evaporation of a sessile droplet on a substrate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(6):1334–1344, 2002.
- [85] Peter J Yunker, Tim Still, Matthew A Lohr, and AG Yodh. Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. *Nature*, 476(7360):308–311, 2011.
- [86] D Kaya, VA Belyi, and M Muthukumar. Pattern formation in drying droplets of polyelectrolyte and salt. *The Journal of chemical physics*, 133(11):114905, 2010.
- [87] Terry P Bigioni, Xiao-Min Lin, Toan T Nguyen, Eric I Corwin, Thomas A Witten, and Heinrich M Jaeger. Kinetically driven self assembly of highly ordered nanoparticle monolayers. *Nature materials*, 5(4):265–270, 2006.
- [88] Frederic M Richards. Areas, volumes, packing, and protein structure. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 6(1):151–176, 1977.
- [89] Fabrizio Chiti and Christopher M Dobson. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature chemical biology*, 5(1):15–22, 2009.
- [90] Tuomas PJ Knowles, Michele Vendruscolo, and Christopher M Dobson. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(6):384–396, 2014.
- [91] Javier De Las Rivas and Celia Fontanillo. Protein–protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol*, 6(6):e1000807, 2010.
- [92] Andrew Chatr-aryamontri, Arnaud Ceol, Luana Licata, and Gianni Cesareni. Protein interactions: integration leads to belief. *Trends in biochemical sciences*, 33(6):241–242, 2008.

- [93] Joel P Mackay, Margaret Sunde, Jason A Lowry, Merlin Crossley, and Jacqueline M Matthews. Protein interactions: is seeing believing? *Trends in biochemical sciences*, 32(12):530–531, 2007.
- [94] Cyrus Chothia and Joël Janin. Principles of protein-protein recognition. *Nature*, 256(5520):705–708, 1975.
- [95] Loredana Lo Conte, Cyrus Chothia, and Joël Janin. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of molecular biology*, 285(5):2177–2198, 1999.
- [96] Philip Ball. Water as an active constituent in cell biology. *Chemical reviews*, 108(1):74–108, 2008.
- [97] TA Witten Jr and Leonard M Sander. Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon. *Physical review letters*, 47(19):1400, 1981.
- [98] Peter J Bentley. Fractal proteins. *Genetic Programming and Evolvable Machines*, 5(1):71–101, 2004.
- [99] DA Weitz and M Oliveria. Fractal structures formed by kinetic aggregation of aqueous gold colloids. *Physical Review Letters*, 52(16):1433, 1984.
- [100] J González-Gutiérrez, JL Carrillo-Estrada, and JC Ruiz-Suárez. Aggregation and dendritic growth in a magnetic granular system. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2013(12):P12015, 2013.
- [101] A Volmer M Weber. Nucleus formation in supersaturated systems. *Z. Phys. Chem*, 119:277, 1926.
- [102] R Becker and W Döring. The kinetic treatment of nuclear formation in supersaturated vapors. *Ann. Phys*, 24(719):752, 1935.
- [103] D Turnbull and J Co Fisher. Rate of nucleation in condensed systems. *The Journal of chemical physics*, 17(1):71–73, 1949.

- [104] AS Myerson and AF Izmailov. The structure of supersaturated solutions. In *Fundamentals*, pages 249–306. Elsevier, 1993.
- [105] Juan Manuel Garcia-Ruiz. Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, 142(1):22–31, 2003.
- [106] Rajesh Patel and Bhupendra Chudasama. Hydrodynamics of chains in ferrofluid-based magnetorheological fluids under rotating magnetic field. *Physical Review E*, 80(1):012401, 2009.
- [107] Carlos Bustamante, Jan Liphardt, and Felix Ritort. The nonequilibrium thermodynamics of small systems. *arXiv preprint cond-mat/0511629*, 2005.
- [108] Denis J Evans and Debra J Searles. Equilibrium microstates which generate second law violating steady states. *Physical Review E*, 50(2):1645, 1994.
- [109] Peter Joseph Yunker. Coffee-rings and glasses: Colloids out of equilibrium. 2012.
- [110] Anna Mitraki and Jonathan King. Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Nature Biotechnology*, 7(7):690–697, 1989.
- [111] Ronald Wetzel. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends in biotechnology*, 12(5):193–198, 1994.
- [112] Ronald Wetzel. For protein misassembly, it’s the decade. *Cell*, 86(5):699–702, 1996.
- [113] Anthony L Fink. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design*, 3(1):R9–R23, 1998.
- [114] Álvaro G Marín, Hanneke Gelderblom, Detlef Lohse, and Jacco H Snoeijer. Order-to-disorder transition in ring-shaped colloidal stains. *Physical review letters*, 107(8):085502, 2011.
- [115] Brian C Tripp, Jules John Magda, and Joseph D Andrade. Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension:

concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics. *Journal of colloid and interface science*, 173(1):16–27, 1995.

- [116] Hyeran Noh and Erwin A Vogler. Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the vroman effect. *Biomaterials*, 28(3):405–422, 2007.
- [117] Dongmao Zhang, Yong Xie, Melissa F Mrozek, Corasi Ortiz, V Jo Davisson, and Dor Ben-Amotz. Raman detection of proteomic analytes. *Analytical chemistry*, 75(21):5703–5709, 2003.
- [118] Jacob Filik and Nicholas Stone. Drop coating deposition raman spectroscopy of protein mixtures. *Analyst*, 132(6):544–550, 2007.
- [119] Rebecca A Halvorson and Peter J Vikesland. Drop coating deposition raman (dcdr) for microcystin-lr identification and quantitation. *Environmental science & technology*, 45(13):5644–5651, 2011.
- [120] Cheng Zhi Huang, Ying Liu, and Yuan Fang Li. Microscopic determination of tetracycline based on aluminum-sensitized fluorescence of a self-ordered ring formed by a sessile droplet on glass slide support. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 34(1):103–114, 2004.
- [121] Ying Liu, YF Li, and CZ Huang. Fluorimetric determination of fluorescein at the femtomole level with a self-ordered ring of a sessile droplet on glass slide support. *Journal of Analytical Chemistry*, 61(7):647–653, 2006.
- [122] Steïphanie Devineau, Manos Anyfantakis, Laurent Marichal, Laurent Kiger, Mathieu Morel, Sergii Rudiuk, and Damien Baigl. Protein adsorption and reorganization on nanoparticles probed by the coffee-ring effect: application to single point mutation detection. *Journal of the American Chemical Society*, 138(36):11623–11632, 2016.
- [123] Yojana JP Carreón, Jorge González-Gutiérrez, MI Pérez-Camacho, and Hilda Mercado-Uribe. Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161:103–110, 2018.

- [124] G Careri, E Gratton, P-H Yang, and JA Rupley. Correlation of ir spectroscopic, heat capacity, diamagnetic susceptibility and enzymatic measurements on lysozyme powder. *Nature*, 284(5756):572, 1980.
- [125] MG Bridelli, R Capelletti, and C Mora. Structural features and functional properties of water in model dmpc membranes: thermally stimulated depolarization currents (tsdcs) and fourier transform infrared (ftir) studies. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(48):485401, 2013.
- [126] Maria Grazia Bridelli and Pier Raimondo Crippa. Infrared and water sorption studies of the hydration structure and mechanism in natural and synthetic melanin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(29):9381–9390, 2010.
- [127] G Careri, A Giansanti, and E Gratton. Lysozyme film hydration events: an ir and gravimetric study. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 18(5):1187–1203, 1979.
- [128] U Buontempo, G Careri, and P Fasella. Hydration water of globular proteins: the infrared band near 3300 cm⁻¹. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 11(2):519–521, 1972.
- [129] Maria Grazia Bridelli. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated biological macromolecules. In *Fourier Transforms-High-tech Application and Current Trends*. InTech, 2017.
- [130] Eric Oropeza-Guzman and Jesús C Ruiz-Suañez. Dehydration/rehydration cycles for mixing phospholipids without the use of organic solvents. *Langmuir*, 34(23):6869–6873, 2018.
- [131] Ruth Hernandez-Perez, Z Hugh Fan, and Jose L Garcia-Cordero. Evaporation-driven bioassays in suspended droplets. *Analytical chemistry*, 88(14):7312–7317, 2016.
- [132] Abraham Savitzky and Marcel JE Golay. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry*, 36(8):1627–1639, 1964.

- [133] John F Brandts. Heat effects in proteins and enzymes. *Thermobiology*, 1967.
- [134] Wilfrid B Veldkamp and Joseph R Votano. Temperature dependence of macromolecular interactions in dilute and concentrated hemoglobin solutions. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 19(1):111–124, 1980.
- [135] Ronald H Schmidt, Vernal S Packard, and Howard A Morris. Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67(11):2723–2733, 1984.
- [136] M Donovan and DM Mulvihill. Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. *Irish Journal of Food Science and Technology*, pages 87–100, 1987.
- [137] DMo Mulvihill and M Donovan. Whey proteins and their thermal denaturation-a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11(1):43–75, 1987.
- [138] PJ Lillford. Physical properties of seed globulins with reference to meat analogue production. In *Proceedings*, 1978.
- [139] William Bate Hardy. On the mechanism of gelation in reversible colloidal systems. *Proceedings of the Royal Society of London*, 66:95–109, 1899.
- [140] Kazuo Hirayama, Satoko Akashi, Mami Furuya, and Ken-ichi Fukuhara. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by esims and frit-fab lc/ms. *Biochemical and biophysical research communications*, 173(2):639–646, 1990.
- [141] Valeria Militello, Carlo Casarino, Antonio Emanuele, Antonella Giostra, Filippo Pullara, and Maurizio Leone. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by ftir spectroscopy and light scattering. *Biophysical chemistry*, 107(2):175–187, 2004.
- [142] Koichi Murayama and Mihoko Tomida. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43(36):11526–11532, 2004.

- [143] Valeria Militello, Valeria Vetri, and Maurizio Leone. Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophysical chemistry*, 105(1):133–141, 2003.
- [144] Theodore Peters Jr. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic press, 1995.
- [145] Daniel C Carter and Joseph X Ho. Structure of serum albumin. In *Advances in protein chemistry*, volume 45, pages 153–203. Elsevier, 1994.
- [146] Roberta G Reed, Richard C Feldhoff, OL Clute, and Theodore Peters Jr. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. conformation and ligand binding. *Biochemistry*, 14(21):4578–4583, 1975.
- [147] Yoshiko Moriyama, Yoshie Kawasaka, and Kunio Takeda. Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation. *Journal of colloid and interface science*, 257(1):41–46, 2003.
- [148] Kunio Takeda, Akira Wada, Kazuo Yamamoto, Yoshiko Moriyama, and Koichiro Aoki. Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment. *Journal of Protein Chemistry*, 8(5):653–659, 1989.
- [149] Miyuki Yamasaki, Hiroshige Yano, and Koichiro Aoki. Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: Ii. effects of neutral salts and urea. *International journal of biological macromolecules*, 13(6):322–328, 1991.
- [150] AH Clark, FJ Judge, JB Richards, JM Stubbs, and A Suggett. Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 17(3):380–392, 1981.
- [151] Yoshiko Moriyama, Emi Watanabe, Kentaro Kobayashi, Hironori Harano, Etsuo Inui, and Kunio Takeda. Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 c and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(51):16585–16589, 2008.

- [152] Hans-Ulrich Gremlich and Bing Yan. *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials*. CRC Press, 2000.
- [153] Heinz Fabian and Werner Mäntele. Infrared spectroscopy of proteins. *Handbook of vibrational spectroscopy*, 2006.
- [154] Aichun Dong, Theodore W Randolph, and John F Carpenter. Entrapping intermediates of thermal aggregation in α -helical proteins with low concentration of guanidine hydrochloride. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36):27689–27693, 2000.

Publicaciones

Durante el desarrollo de mi programa doctoral publicamos 3 artículos en revistas arbitradas. El primero, se elaboró y publicó durante el primer año de doctorado y es resultado de mi tesis de maestría: “Dielectric spectroscopy of biomolecules at low frequencies: Evidence of proton wires”, publicado en Journal of Molecular Liquids. El segundo, contempla los hallazgos más relevantes contenidos en el capítulo 2: “Patterns produced by dried droplets of protein binary mixtures suspended in water”, publicado en Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. El tercero, fue resultado de una colaboración: “Texture analysis of protein deposits produced by droplet evaporation”, publicado en Scientific Reports.

Participación en eventos científicos

Además, participé en dos eventos científicos nacionales. El primero en: “V Reunión de la Red Temática de Materia Condensada Blanda 2017”. El segundo en “LX Congreso Nacional de Física 2017”. En éste último, obtuve el primer lugar en el concurso de carteles “Carlos Graef Fernandez”, con el trabajo titulado “Evidencia de alambres de protones en biomoléculas mediante espectroscopía dieléctrica”.